



**Charakterisierung kleiner G-Proteine
der Ras- und Rho/Rac-Familie in *Ustilago maydis*:
Zentrale Schalter in komplexen Netzwerken
und ihr Einfluss auf die Organisation der Zellmorphologie**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von
Michael Mahlert
aus Rotenburg/Fulda

Marburg/Lahn 2006

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Michael Bölker von November 2002 bis August 2006 an der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

vom Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation

angenommen im: Oktober 2006

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Michael Bölker

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch

Tag der mündlichen Prüfung am: 1.12.2006

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

Leveleki, L., Mahlert, M., Sandrock, B. and Bölker, M. (2004) The PAK family kinase Cla4 is required for budding and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **54**, 396-406.

Mahlert, M., Leveleki, L., Hlubek, A., Sandrock, B. and Bölker, M. (2006) Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **59**, 567-578.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel “Charakterisierung kleiner G-Proteine der Ras- und Rho/Rac-Familie in *Ustilago maydis*: Zentrale Schalter in komplexen Netzwerken und ihr Einfluss auf die Organisation der Zellmorphologie“ selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort, Datum)

Michael Mahlert

Für meine Eltern

Zusammenfassung

Kleine G-Proteine haben in eukaryotischen Zellen vielfältige regulatorische Aufgaben. Sie wirken als molekulare Schalter, die im GTP-gebundenen Zustand aktiv, im GDP-gebundenen Zustand hingegen inaktiv sind. Im GTP-gebundenen Zustand sind sie in der Lage, mit Effektoren zu interagieren und diese zu aktivieren. Kleine G-Proteine sind an sehr verschiedenen Prozessen, wie der Regulation der Genexpression und der Zellproliferation, der Organisation des Zytoskeletts und des Vesikelverkehrs beteiligt.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung von kleinen G-Proteinen der Rho/Rac- und der Ras-Familie im phytopathogenen Basidiomyceten *Ustilago maydis*. Dieser Pilz eignet sich aufgrund seiner dimorphen Lebensweise gut als Modellorganismus, um die Regulation der Zellmorphologie zu untersuchen. Kleinen G-Proteinen der Rho/Rac-Familie wird hauptsächlich die Organisation des Aktin-Zytoskeletts zugeschrieben, weshalb der Einfluss dieser Proteine auf die Zellmorphologie groß ist. In *U. maydis* führt das Ausschalten des Rho/Rac-Proteins Cdc42 anders als in *Saccharomyces cerevisiae* nicht zur Letalität, sondern lediglich zu einem Defekt in der Zellseparation und zu Paarungsdefekten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Ausschalten des nahe verwandten Proteins Rac1 zu Defekten in der Knospenbildung und im filamentösen Wachstum führt. Trotz der defekten Knospenbildung sind *rac1*-Deletionsmutanten aber lebensfähig und teilen sich durch Abschnürung an einem zentralen Septum. Überexpression von *rac1* führt zu filamentösem Wachstum, während *rac1*-Deletionsmutanten nicht zur Filamentbildung der Lage sind. Das zeigt, dass Rac1 notwendig und hinreichend für das Umschalten des Wachstumsmusters in *U. maydis* ist. Die Expression einer konstitutiv aktiven Version von Rac1 führt zu starker Vakuolisierung und zum Aufblähen der Zellen sowie zum Zellzyklusarrest. Durch die Analyse einer Doppelmutante von *cdc42* und *rac1* konnten außerdem redundante Funktionen der beiden Proteine in der Regulation der Vesikelfunktion aufgedeckt werden. Dies erklärt auch die Lebensfähigkeit von *U. maydis* in Abwesenheit von Cdc42.

Die Analyse von Ras1 im ergab, dass es sich hierbei um ein essentielles Protein handelt. In Abwesenheit von Ras1 bilden sich Cluster von großen, kugelrunden und einfach septierten Zellen, die Defekte in der Kernverteilung aufweisen. Der morphologische Phänotyp ähnelt dem einer *cdc42/rac1*-Doppelmutante. Auch in der Vakuolenfusion treten hier ähnliche Defekte auf. Eine Epistasis-Analyse ergab, dass Ras1 die Vakuolenfusion über die Aktivierung von Rac1 steuert, und gibt einen Hinweis auf die regulatorische Vernetzung der kleinen G-Proteine. Die Überexpression des Wildtypallels von *ras1* führt zu Filamentbildung.

Dieses Signal wird unabhängig von Rac1 vermittelt, allerdings sind die Filamente in Abwesenheit von Rac1 deutlich dicker. Die Expression einer konstitutiv aktiven Version von *ras1* führt nicht zur Filamentbildung, was zeigt, dass hierfür ein intakter GTPase-Zyklus des Proteins wichtig ist. Sehr starke Expression der konstitutiv aktiven Version führt zu einer starken Hyperseptierung der Zellen. Dieser morphologische Phänotyp stellt sich bei sehr starker Expression der wildtypischen Version in abgeschwächter Form ebenfalls ein.

Desweiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Ras1, anders als bisher vermutet, auch die MAPK-Kaskade aktivieren kann. Die starke Überexpression der konstitutiv aktiven Version führt zu sehr starker Aktivierung dieses Signalweges. Die MAPK-Kaskade kann in *U. maydis* also von beiden Ras-Proteinen aktiviert werden. Der cAMP-Signalweg hingegen kann von Ras1, nicht aber von Ras2 aktiviert werden. Durch die Analyse der Expression von *ras1* und *ras2* bei konstitutiver Aktivität bzw. Inaktivität des cAMP-Signalweges bzw. der MAPK-Kaskade konnte ein Modell aufgestellt werden, nach dem der cAMP-Signalweg die Aktivität der MAPK-Kaskade über die Expression von Ras2 beeinflussen kann.

Abkürzungen und Fachbegriffe

AB	Antibiotikum	ORF	„open reading frame“
Abb.	Abbildung	PAK	p21 aktivierte Kinase
Amp	Ampicillin	PCR	„polymerase chain reaction“
ATP	Adenosin-Triphosphat	PD	„potato dextrose“
bp	Basenpaar	PEG	Polyethylenglycol
BSA	„bovine serum albumin“	PKA	Proteinkinase A
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	Ppi	Peptidyl-Prolyl <i>cis-trans</i> Isomerase
Cbx	Carboxin	RNA	Ribonukleinsäure
CM	„complete medium“	RNAse	Ribonuklease
CM-A	CM-Medium mit 1 % Arabinose	rpm	„rotations per minute“
CM-G	CM-Medium mit 1 % Glukose	RT	Raumtemperatur
CMAC	7-amino-4-chloromethylcumarin (CellTracker™ blue)	SDS	„sodium dodecyl sulfate“
CRIB	Cdc42/Rac1 interactive binding domain	Tab.	Tabelle
C-Terminus	Carboxy-Terminus	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
CTP	Cytosin-Triphosphat	T_m	mittlere Schmelztemperatur
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid	Tris	Trishydroxylmethylaminomethan
DEPC	Diethylpyrocarbonat	TTP	Thymidin-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure	ÜNK	Übernachtskultur
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat	UV	ultraviolettes Licht
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure	vgl.	vergleiche
FM4-64	N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(p-diethylaminophenyl)hexatrienylpyridiniumdibromid	WT	Wildtyp
GDP	Guanosin-Diphosphat	YEP	„yeast extract + peptone“
GTP	Guanosin-Triphosphat	YEP-A	YEP-Medium mit 2 % Arabinose
H₂O bidest.	zweifach destilliertes Wasser	YEP-G	YEP-Medium mit 2 % Glukose
Hyg	Hygromycin	YNB	„yeast nitrogen base“
kb	Kilobase	YNB-A	YNB-Medium mit 2 % Arabinose und 0,5% Ammoniumsulfat
kD	Kilodalton	YNB-A-NH₄	siehe YNB-A
MCS	Multiple Cloning Site	YNB-A-NO₃	YNB-Medium mit 2 % Glukose und 0,5 % Kaliumnitrat
MM	Minimalmedium	YNB-G	YNB-Medium mit 2 % Glukose und 0,5 % Ammoniumsulfat
NAT	Nourseothricin	YNB-G-NH₄	siehe YNB-G
NLS	„nuclear localization signal“	YNB-G-NO₃	YNB-Medium mit 2 % Glukose und 0,5 % Kaliumnitrat
N-terminus	Amino-Terminus	X-Gal	5-Bromo-4-chloro-1-indol-β-D-galactosid
OD₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm	z.B.	Zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE	III
INHALTSVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 Kleine GTP-bindende Proteine – Eine Familie regulatorischer Proteine in Eukaryoten	1
1.1.1 Überblick	1
1.1.2 Struktureller Aufbau	3
1.2 Die Ras-Proteine	4
1.3 Die Rho/Rac-Familie	8
1.3.1 Überblick	8
1.3.2 Das kleine G-Protein Cdc42	9
1.3.3 Das kleine G-Protein Rac1	10
1.3.4 Cdc42 und Rac1 als Komponenten von Signalkaskaden	11
1.4 <i>Ustilago maydis</i> als genetischer Modellorganismus	13
1.4.1 Überblick	13
1.4.2 Lebenszyklus	14
1.4.3 Genetik des Kreuzungssystems	15
1.5 Die Funktion von kleinen G-Proteinen in <i>Ustilago maydis</i>	18
1.5.1 Die Ras-Proteine	18
1.5.2 Die Proteine der Rho/Rac-Familie	20
1.6 Zielsetzung	25
2 ERGEBNISSE	26
2.1 Deletion von <i>rac1</i> in <i>U. maydis</i>	26
2.1.1 Konstruktion einer <i>rac1</i> -Deletionsmutante	26
2.1.2 <i>rac1</i> -Deletionsmutanten weisen Defekte in der Zellmorphologie auf	27
2.1.3 <i>rac1</i> -Deletionsmutanten zeigen Defekte im Kreuzungsverhalten	30
2.2 Rac1 reguliert das filamentöse Wachstum	31
2.2.1 Überexpression von <i>rac1</i> induziert filamentöses Wachstum	31
2.2.2 Rac1 ist notwendig für die b-abhängige Filamentbildung	34
2.2.3 <i>rac1</i> -Deletionsmutanten sind apathogen	35
2.3 Dominant aktives Rac1^{Q61L} wirkt letal	36
2.3.1 Überexpression von <i>rac1</i> ^{Q61L}	36
2.3.2 Das polare Wachstum ist in <i>rac1</i> -Deletionsmutanten gestört	39
2.4 Cla4 ist ein Effektor von Rac1	40
2.4.1 <i>cla4</i> -Deletionsmutanten bilden kein <i>rac1</i> -abhängiges Filament	40
2.4.2 Die von Rac1 ^{Q61L} hervorgerufenen Effekte werden in <i>cla4</i> -Deletionsmutanten teilweise supprimiert	41
2.5 Redundante Funktionen von Cdc42 und Rac1 in der Regulation des Vesikelverkehrs	44
2.5.1 Konstruktion einer <i>cdc42/rac1</i> -Doppelmutante	44
2.5.2 Die Abwesenheit von Cdc42 und Rac1 ist letal	46

2.5.3	Cdc42 und Rac1 haben redundante Funktionen in der Regulation des Vesikelverkehrs	47
2.5.4	Die Vesikelfusion ist in der <i>cdc42/rac1</i> -Doppelmutante blockiert	49
2.5.5	Cla4 ist an der Vakuolenbildung beteiligt	51
2.6	Ras1 ist ein essentielles Protein	53
2.6.1	Konstruktion einer konditionalen <i>ras1</i> -Mutante	53
2.6.2	Die Abwesenheit von Ras1 führt zu morphologischen Defekten und zu fehlerhafter Kernverteilung	54
2.7	Ras1 ist ein zentraler Regulator der Vakuolenfusion	57
2.7.1	Die Abwesenheit von Ras1 führt zur Blockade der Vesikelfusion	57
2.7.2	Ras1 reguliert die Vakuolenfusion über die Aktivierung von Rac1	58
2.8	Die Auswirkungen erhöhter Aktivität von Ras1	60
2.8.1	Überexpression von dominant aktivem <i>ras1^{Q67L}</i>	60
2.8.2	<i>ras1^{Q67L}</i> induziert die Expression von <i>mfal</i> über die MAPK-Kaskade	62
2.8.3	Der Effekt von Ras1 ist abhängig von der Expressionsstärke	65
2.8.4	Die morphologischen Effekte von Ras1 werden unabhängig von Cdc42 und Rac1 vermittelt	70
2.9	Ras1 lokalisiert an der Zellmembran	71
2.10	Die Expression von <i>ras2</i> ist abhängig vom cAMP-Signal	73
3	DISKUSSION	76
3.1	Weder Cdc42 noch Rac1 sind in <i>Ustilago maydis</i> essentiell	76
3.2	Cla4 ist ein Effektor von Rac1	78
3.3	Rac1 reguliert filamentöses Wachstum	79
3.4	Die Funktion von Rac1 beim Knospenwachstum	82
3.5	Cdc42 und Rac1 werden für die Pathogenität benötigt	83
3.6	Ras1 beeinflusst die Filamentbildung und die Septierung	86
3.7	Ras1 induziert die Filamentbildung unabhängig von Rac1	88
3.8	Ras1 ist essentiell für das polare Wachstum	89
3.9	Die Kernverteilung ist abhängig von Ras1	91
3.10	Die Ras-abhängigen Signalwege in <i>U. maydis</i>	91
3.11	Die Funktionen der kleinen G-Proteine im Vesikelverkehr	97
4	MATERIAL	101
4.1	Allgemeine Materialien und Bezugsquellen	101
4.1.1	<i>U. maydis</i> -Stämme	101
4.1.2	<i>Escherichia coli</i> -Stämme	101
4.1.3	Chemikalien	102
4.1.4	Kits	104
4.1.5	Enzyme und Proteine	104
4.1.6	Sonstige Materialien	105
4.1.7	Puffer und Lösungen	105
4.1.8	Medien zur Kultivierung von <i>U. maydis</i>	109
4.1.9	Medien zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	111
4.1.10	Nukleinsäuren	111

4.1.10.1	Plasmide	111
4.1.10.2	λ -DNA	115
4.1.10.3	Oligonukleotid-Primer	116
5	METHODEN	118
5.1	Anzucht von Mikroorganismen	118
5.1.1	Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	118
5.1.2	Anzucht von <i>U. maydis</i>	118
5.2	DNA-Präparationen	119
5.2.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> - analytischer Maßstab	119
5.2.2	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> - präparativer Maßstab	120
5.2.3	Präparation DNA aus <i>U. maydis</i> für PCR	120
5.2.4	Präparation von DNA aus <i>U. maydis</i> für Southern Blot	120
5.3	Amplifikation und Klonierung von DNA	121
5.3.1	Amplifikation von DNA über Polymerase-Kettenreaktion	121
5.3.2	Restriktions-Analyse von DNA	123
5.3.3	Dephosphorylierung von DNA	123
5.3.4	Ligation von DNA-Fragmenten	124
5.4	Analyse von DNA	124
5.4.1	Bestimmung der DNA-Konzentration	124
5.4.2	Trennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese	124
5.4.3	DNA-Sequenzierung	125
5.4.4	Transfer und Detektion von DNA auf Membranen	126
5.5	Präparation von RNA	127
5.6	Analyse von RNA	128
5.6.1	Auftrennung von RNA durch Agarosegelelektrophorese	128
5.6.2	Transfer und Detektion von RNA auf Membranen	129
5.6.3	Quantifizierung der Bandenintensität	130
5.7	Transformationen	130
5.7.1	Herstellung elektro-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	130
5.7.2	Elektro-Transformation von elektrokompententen <i>E. coli</i> -Zellen	131
5.7.3	Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	131
5.7.4	Transformation chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	131
5.7.5	Protoplastierung von <i>U. maydis</i>	132
5.7.6	Transformation von <i>U. maydis</i> -Protoplasten	132
5.7.7	Integration von Vektoren in den genomischen <i>ip</i> -Locus	133
5.8	Untersuchung von <i>U. maydis</i>	134
5.8.1	Infektion von Maispflanzen und Isolierung haploider Nachkommen	134
5.8.2	Test des Kreuzungsverhaltens auf Charcoal-PD-Agar	134
5.8.3	Mikroskopie	135
5.8.3.1	Färbungen	135
5.8.3.2	Movies	137
6	LITERATUR	138
	ANHANG	150
	Movies	150

1 Einleitung

1.1 Kleine GTP-bindende Proteine – Eine Familie regulatorischer Proteine in Eukaryoten

1.1.1 Überblick

Die Steuerung der komplexen Vorgänge, die in lebenden Zellen ablaufen, sowie schnelle Reaktionen auf sich verändernde Umweltbedingungen erfordern ausgefeilte regulatorische und sensorische Netzwerke. Zentrale Bausteine dieser Netzwerke sind in Eukaryoten Signalkaskaden, die durch endogene oder exogene Reize aktiviert werden, das Signal weiterleiten und vielfach auch verstärken. In diesen Signalkaskaden spielen kleine GTP-bindende Proteine eine entscheidende Rolle. Sie wirken als molekulare Schalter (Takai et al., 2001), die in zwei unterschiedlichen Zuständen vorkommen (Abb. 1-1): Im GTP-gebundenen Zustand sind sie aktiv, im GDP-gebundenen Zustand inaktiv (Bourne et al., 1990; Gibbs et al., 1984). Im aktiven Zustand liegen die kleinen G-Proteine in einer Konformation vor, die eine Interaktion mit Effektoren begünstigt und zu deren Aktivierung führt (Bourne et al., 1990).

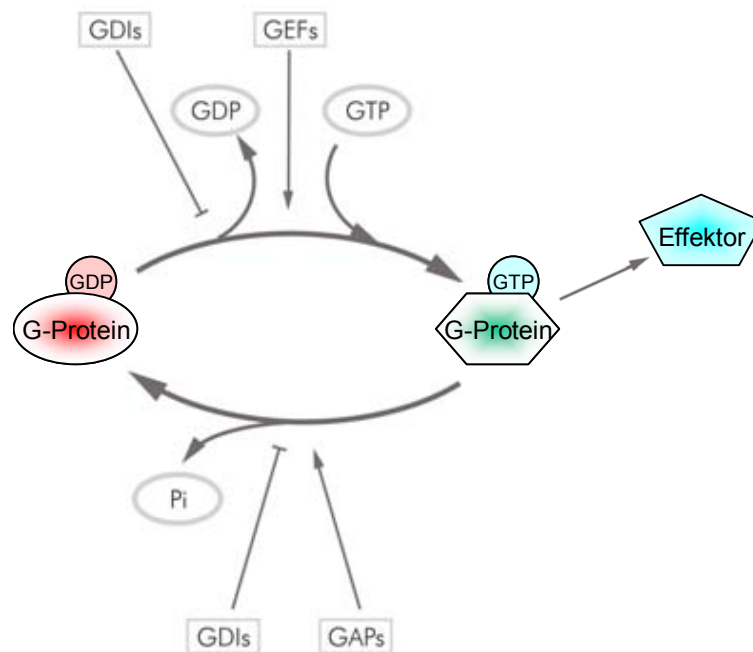


Abbildung 1-1: Zyklus der Aktivierung und Deaktivierung von kleinen G-Proteinen.

Kleine G-Proteine werden über den Austausch von GDP zu GTP aktiviert, der von GEFs (guanine nucleotide exchange factors) vermittelt wird. Das aktive G-Protein ist in der Lage, mit Effektoren zu interagieren und sie dadurch zu aktivieren. Die Deaktivierung wird von GAPs (GTPase activating proteins) vermittelt, die die GTPase-Aktivität des Proteins erhöhen. GDIs (guanine nucleotide dissociation inhibitors) binden sowohl die GTP- als auch die GDP-gebundene Form und halten sie abgeschirmt im Zytoplasma fest.

Die Aktivität der kleinen G-Proteine wird durch Wechselwirkung mit regulatorischen Proteinen geregelt. So beladen „Guanine nucleotide exchange“-Faktoren (GEFs) die Proteine mit GTP und führen so zu deren Aktivierung (Schmidt and Hall, 2002). Der aktive Zustand kleiner G-Proteine ist im Gegensatz zur Situation in den $G\alpha$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine recht stabil, da die intrinsische GTPase-Aktivität der kleinen G-Proteine sehr gering ist. Daher ist auch die alternativ verwendete Bezeichnung „kleine GTPase“ irreführend. Die Inaktivierung der Proteine wird durch „GTPase activating proteins“ (GAPs) vermittelt (Gibbs et al., 1984). Diese Proteine komplettieren das katalytische Zentrum des G-Proteins, das für die GTP-Hydrolyse zuständig ist, und überführen so das Protein in die inaktive, GDP-gebundene Form (Scheffzek et al., 1996). Eine dritte Klasse regulatorischer Proteine stellen die so genannten „guanine nucleotide dissociation inhibitors“ (GDIs) dar. Diese Proteine verhindern die Dissoziation des gerade gebundenen Nukleotids und stabilisieren so den GDP- oder den GTP-gebundenen Zustand (Sasaki et al., 1990). Außerdem interagieren GDIs mit der hydrophoben Modifikation der G-Proteine am Carboxyl-Terminus (Prenylierung) und sind dadurch an der Regulation der intrazellulären Lokalisierung dieser Proteine beteiligt (Isomura et al., 1991).

Anhand der unterschiedlichen Funktionen in der Zelle wird die Superfamilie der kleinen G-Proteine, die über 100 Mitglieder enthält, in fünf Subfamilien eingeteilt (Takai et al., 2001): Die Ras-, Rho-, Rab-, Sar1/Arf- sowie die Ran-Familie. Ras-ähnliche Proteine beeinflussen die Genexpression und sind unter anderem an der Regulation der Zellproliferation beteiligt. Dominante Mutationen, die zu einer konstitutiven Aktivierung der Ras-Proteine führen, tragen häufig zur Tumorentstehung beim Menschen bei. Bezeichnenderweise wurde das Ras-Protein zunächst in einer mutierten Form als Onkogen aus Tumorigenen isoliert (Dhar et al., 1982). Sein ubiquitäres Vorkommen als essentielles regulatorisches Protein wurde erst später deutlich. Die G-Proteine der Rho-Familie sind hauptsächlich an der Organisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt (Johnson and Pringle, 1990; Ridley and Hall, 1992; Ridley et al., 1992). Außerdem können Mitglieder dieser Familie Einfluss auf die Genexpression nehmen (Hill et al., 1995). Auch Funktionen im zellulären Vesikeltransport wurden beschrieben (Lamaze et al., 1996). Hauptsächlich wird diese Aufgabe allerdings den Mitgliedern der Rab- und Sar1/Arf-Familie zugeschrieben (Plutner et al., 1991; Stein et al., 2003). Die Proteine der Ran-Familie schließlich vermitteln den Transport zwischen Zellkern und Zytoplasma über die Kernporen. Außerdem haben sie Funktionen in der Organisation der Mikrotubuli während der Mitose (Carazo-Salas et al., 2001).

1.1.2 Struktureller Aufbau

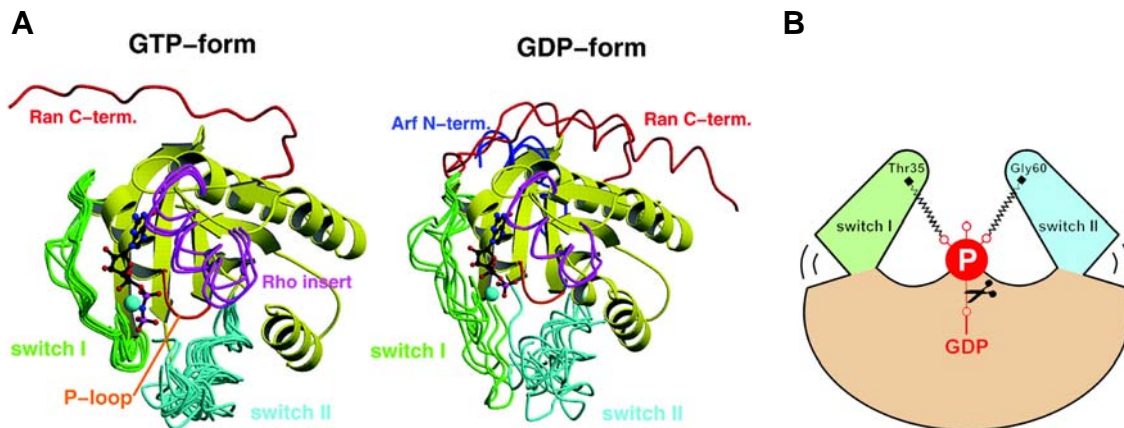


Abbildung 1-2: Die strukturelle Natur des molekularen Schalters.

A: Überlagerung dreidimensionaler Strukturen einer Auswahl von Ras-artigen Proteinen. Die Strukturen der Switch1- und Switch2-Regionen (grün und hellblau) unterscheiden sich in der GDP-gebundenen Form viel deutlicher voneinander als in der GTP-gebundenen Form. Violett: Rho-Insert-Domäne aus Rho, Arf und Ran. Rot: COOH-Terminus von Ran. Dunkelblau: NH₂-Terminus von Arf. B: Schematisches Modell des dem molekularen Schalter zugrunde liegenden Mechanismus. Die Switch1- und Switch2-Domänen werden in der aktivierten Form über Wasserstoffbrücken an das γ -Phosphat des GTP gebunden. Hierfür sind die Hauptketten-NH-Gruppen eines invarianten Threonins in der Switch1-Domäne und eines invarianten Glycins in der Switch2-Domäne verantwortlich. Abspaltung des γ -Phosphats im Verlauf der GTP-Hydrolyse führt zum Wegfall dieser Wasserstoffbrückenbindungen und damit zur Relaxation der Switch-Domänen, die zur Inaktivierung des kleinen G-Proteins führen (aus Vetter and Wittinghofer, 2001).

In ihrem strukturellen Aufbau sind sich alle Kleinen G-Proteine sehr ähnlich (Abb. 1-2). Sie besitzen ein Konsensusmotiv für die GTPase-Aktivität und die Bindung von GDP und GTP (Valencia et al., 1991). Dieses Motiv ist in vier Domänen über die Proteinsequenz verteilt. Es ist die Grundlage für die Funktion der kleinen G-Proteine als molekularer Schalter, da die Bindung von GDP beziehungsweise GTP den Zustand des Proteins bestimmt. Mutationen in diesem Motiv können den GTPase-Zyklus an unterschiedlichen Stellen blockieren und so konstitutiv aktive oder konstitutiv inaktive Proteine hervorrufen. So befindet sich zum Beispiel in der zweiten Domäne ein hochkonserviertes Glutamin (Q61). Dieses bildet mit einem Wassermolekül Wasserstoffbrücken aus und positioniert es für den hydrolytischen Angriff auf das γ -Phosphat des GTP (Frech et al., 1997). Mutation dieses Glutamins zu Leucin führt zum Verlust der GTPase-Aktivität und damit zu einem konstitutiv aktivierten Protein (Ziman et al., 1991). Eine weitere Mutation, von Threonin-17 zu Asparagin, hat eine deutlich geringere Affinität des Proteins zu GTP als zu GDP zur Folge, was zu konstitutiv inaktiven Proteinen führt (Feig and Cooper, 1988).

Kleine G-Proteine besitzen außerdem eine ausgedehnte Region an der Proteinoberfläche, die für die Interaktion mit Effektoren verantwortlich ist. Kristallographische Analysen

verschiedener G-Proteine haben gezeigt, dass sich die meisten Proteine auch in der räumlichen Struktur ähneln (Abb. 1-2a) und verdeutlichen auch, dass der Austausch von GDP zu GTP zu einer drastischen strukturellen Veränderung in den Proteinen führt (Milburn et al., 1990). Am Beispiel des Ras-Proteins konnte gezeigt werden, dass hier sind vor allem die Switch1- und die Switch2-Region entscheidend sind. Diese hochflexiblen Regionen liegen in der Umgebung des γ -Phosphats des GTPs im aktiven Protein. Ein invariantes Threonin in Switch1 und ein invariantes Glycin in Switch2 bilden mit dieser γ -Phosphatgruppe Wasserstoffbrücken aus (Pai et al., 1989; Vetter and Wittinghofer, 2001). Der Wegfall dieser Wasserstoffbrücken nach GTP-Hydrolyse führt zu einer deutlichen Konformationsänderung im Protein, in deren Verlauf die Switch-Domänen ihre Position drastisch ändern (Abb. 1-2b). Die Mitglieder der Ras-, der Rho/Rac- und der Rab-Familie besitzen an ihrem C-Terminus ein Konsensusmotiv für posttranslationale Modifikation durch Farnesylierung bzw. Geranylgeranylierung. Außerdem finden sich bei manchen GTP-bindenden Proteinen auch noch Aminosäuregruppen, die durch Anhängen eines Palmitylrestes ebenfalls zur Membranassoziiierung des Proteins beitragen (Adamson et al., 1992; Willumsen et al., 1984). RhoGDIs sind allerdings in der Lage, die G-Proteine der Rho/Rac-Familie von der Membran abzuziehen und im Zytoplasma festzuhalten, indem sie die hydrophoben Anhänge umschließen (Michaelson et al., 2001). Proteine der Arf-Familie werden am N-Terminus durch Myristilierung modifiziert (Moss and Vaughan, 1995).

1.2 Die Ras-Proteine

Die Ras-Familie der kleinen G-Proteine enthält eine Vielzahl von Subfamilien, wie zum Beispiel die der Ras-, der Rap- und der Ral-Proteine (Takai et al., 2001). Von diesen Subfamilien ist die der Ras-Proteine bei weitem am besten untersucht. Im Menschen sind drei unterschiedliche Ras-Proteine beschrieben worden: H-Ras, K-Ras und N-Ras. Diese Proteine spielen eine zentrale Rolle in verschiedenen Signaltransduktionskaskaden. Die meisten Hinweise auf diese Rolle ergaben sich aus den transformierenden Eigenschaften onkogener Ras-Proteine auf Zelllinien von Säugetieren und aus der Untersuchung orthologer Proteine in den genetisch leichter zugänglichen metazoen Organismen *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans*. Ein sehr gut charakterisierter Signalweg, der von Ras-Proteinen reguliert wird, ist die RTK/Ras/MAP-Kinase-Kaskade (Abb. 1-3). Diese Kaskade wird aktiv,

wenn durch extrazelluläre Signale Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aktiviert werden. Die phosphorylierten Tyrosine dienen als Andockstelle für Adapterproteine wie GRB2, die den Ras-GEF SOS rekrutieren (Li et al., 1993; Olivier et al., 1993). Dies führt zur lokalen Aktivierung von membrangebundenem Ras. Das aktive Ras wiederum ist in der Lage, mit der Proteinkinase Raf zu interagieren und sie zu aktivieren (Vojtek et al., 1993).

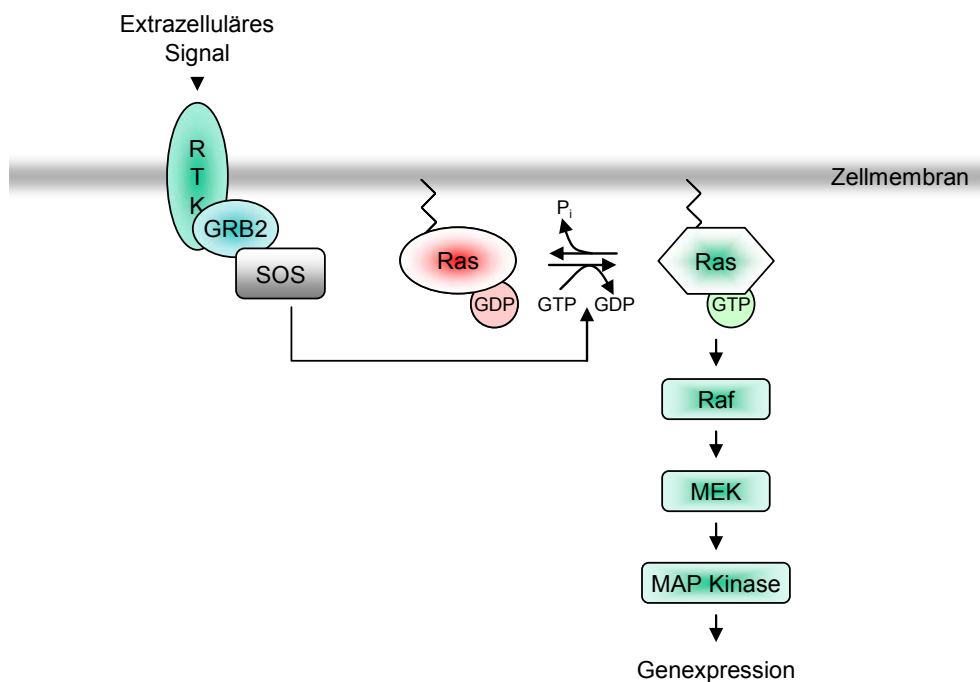


Abbildung 1-3: Übersicht über die RTK/Ras/MAP-Kinase-Kaskade.

Rezeptor-Tyrosin-Kinasen autophosphorylieren als Reaktion auf extrazelluläre Signale spezifische Tyrosinreste. Diese rekrutieren Adapterproteine wie GRB2, die dann den Ras-GEF SOS an die Zellmembran bringen. Dort aktiviert er das membrangebundene G-Protein Ras, die dann mit der MAPKKK Raf interagiert und diese aktiviert. Diese phosphoryliert die MAPKK MEK, welche das Signal an die MAP-Kinase weiterleitet. Die aktivierte MAP-Kinase transloziert in den Zellkern und beeinflusst die Genexpression (modifiziert nach Takai et al., 2001).

Raf wird durch die Interaktion mit Ras-GTP an die Plasmamembran gebracht und phosphoryliert im Folgenden die Proteinkinase MEK (Huang et al., 1993), die dann die MAP-Kinase aktiviert. Diese wird dann in den Zellkern gebracht, wo sie eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren aktivieren kann. Die hier beschriebene MAP-Kinase-Kaskade ist entscheidend für viele Wachstums- und Differenzierungsprozesse in Säugetieren. Aber auch in *D. melanogaster* und *C. elegans* ist sie an der Entwicklung beteiligt (Kayne and Sternberg, 1995; Wassarman et al., 1995).

Ras-Proteine werden allerdings nicht nur über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen-vermittelte Wege aktiviert. Es existiert eine Vielzahl anderer Möglichkeiten. Zum Beispiel wurde gezeigt, dass auch Rezeptoren, die an heterotrimere G-Proteine gekoppelt sind, Ras aktivieren können

(Howe and Marshall, 1993). Auch gibt es eine Vielzahl weiterer Effektoren, wie zum Beispiel die Phosphatidylinositol-3-Kinase (Rodriguez-Viciano et al., 1994). Diese Beispiele verdeutlichen, dass das Signalnetzwerk, an dem die Ras-Proteine beteiligt sind, sehr dynamisch und komplex ist.

Der erste beschriebene Effektor von Ras-Proteinen war allerdings die Adenylatzyklase (Broek et al., 1985; Toda et al., 1985). Diese wird in vielen Mikroorganismen von Ras aktiviert (Weeks and Spiegelman, 2003), während sie in Säugetieren direkt der Regulation von heterotrimeren G-Proteinen unterliegt. Die Adenylatzyklase ist der zentrale Baustein des in Eukaryoten universellen cAMP-Signalwegs (siehe Abb. 1-8). Dieser besteht aus drei Hauptkomponenten (Johnson et al., 2001; Taylor et al., 1990): Der Adenylatzyklase, dem von ihr gebildeten cAMP und der Proteinkinase A (PKA). Als Holoenzym setzt die PKA sich aus regulatorischen und katalytischen Untereinheiten zusammen. Die Bindung des von der Adenylatzyklase gebildeten cAMP an die hochaffinen Bindestellen der regulatorischen Untereinheiten führt zu deren Dissoziation und damit zur Aktivierung der katalytischen Untereinheiten der PKA (siehe auch Abb. 1-8). In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wurden die *ras*-Gene, *ras1* und *ras2*, gründlich untersucht. Sie zeigen eine deutliche Sequenzverwandtschaft (Katayama et al., 1996). Der Funktionsverlust jeweils eines der beiden Gene hat keine Auswirkung auf das Wachstum in Glukose, der gleichzeitige Funktionsverlust beider Gene resultiert hingegen in einem Zellzyklus-Arrest in G1. Beide Ras-Proteine können die Adenylatzyklase aktivieren, und Zellen, die konstitutiv aktive Ras-Proteine exprimieren, weisen eine höhere Konzentration von cAMP auf (Toda et al., 1985). Die Letalität einer *ras1/ras2*-Doppelmutante kann durch Ausschalten der regulatorischen Untereinheit oder durch Überexpression der katalytischen Untereinheit der PKA supprimiert werden. Der cAMP-Signalweg in *S. cerevisiae* reagiert auf das Vorhandensein einer verwertbaren Zuckerquelle im Medium und ist essentiell für das Durchlaufen der G1-Phase des Zellzyklus (Thevelein and de Winde, 1999). Lange Zeit wurde angenommen, dass dies über den Ras-GEF Cdc25p, über Ras und den durch Ras aktivierten cAMP-Signalweg vermittelt wird (Thevelein, 1991). Allerdings konnte später gezeigt werden, dass die Aktivierung der Adenylatzyklase als Antwort auf Zuckerquellen unabhängig von Ras erfolgt und stattdessen über den G-Protein gekoppelten Rezeptor Gpr1p und das G α -Protein Gpa2p verläuft (Thevelein and de Winde, 1999). Ras2p ist in *S. cerevisiae* an der Regulation des Pseudohyphenwachstums beteiligt. Diese Wachstumsform tritt bei diploiden Zellen als Antwort auf Stickstoffmangel auf. Es existieren zwei Signalwege, die das Pseudohyphenwachstum regulieren. An beiden ist Ras2p beteiligt. Der erste Signalweg

verläuft über eine MAP-Kinase-Kaskade (Mösch and Fink, 1997; Mösch et al., 1996; Roberts et al., 1997). Ras2p aktiviert hier das kleine G-Protein Cdc42p, ein Mitglied der Rho/Rac-Familie (Abb. 1-6). Cdc42p leitet das Signal über Ste20p, eine Kinase der PAK-Familie, an eine MAP-Kinase-Kaskade bestehend aus Ste11p, Ste7p und Kss1p weiter. Der zweite Signalweg, der in *S. cerevisiae* Pseudohyphenwachstum induziert, wird über den G-Protein gekoppelten Rezeptor Gpr1p aktiviert (Kübler et al., 1997; Lorenz and Heitman, 1997), der das Signal über das G α -Protein Gpa2p weiterleitet. Dieses aktiviert dann über Ras2p die Adenylatzyklase und damit die PKA (Pan and Heitman, 1999). In haploiden Hefezellen beobachtet man unter bestimmten Bedingungen eine weitere Wachstumsform, die sehr viele Ähnlichkeiten mit dem Pseudohyphenwachstum aufweist: Das invasive Wachstum (Roberts and Fink, 1994). Auch hier ist Ras2p essentiell (Mösch et al., 1999) und interessanterweise sind auch hier beide Signalkaskaden involviert.

Ein weiterer Effektor von Ras in Säugetieren ist Ral-GDS. Dieses Protein wirkt als GEF für das G-Protein Ral (Hofer et al., 1994; Spaargaren and Bischoff, 1994) und besitzt eine Ras-Bindedomäne, über die es von Ras aktiviert werden kann. Dass Ral-GDS ein wichtiger Effektor von Ras ist, zeigt sich daran, dass Ral-GDS notwendig und auch hinreichend für die Ras-abhängige Transformation ist (Hamad et al., 2002). Ein weiterer Effektor von Ras ist Rin1 (Han and Colicelli, 1995; Han et al., 1997). Über diesen GEF kann Ras das G-Protein Rab5 aktivieren, die Funktionen in der Endocytose hat (Tall et al., 2001). Diese beiden Beispiele zeigen, dass Ras in vielen Fällen aktivierende Funktionen auf andere kleine G-Proteine ausübt. Ein weiteres Beispiel hierfür ist der Ras-Effektor Tiam1. Es handelt sich hierbei um einen Rac-GEF, der eine Ras-Bindedomäne enthält. Ras kann Tiam1 binden und seine GEF-Aktivität stimulieren (Lambert et al., 2002). Tiam1 ist also ein wichtiger Vermittler zwischen Ras und Rac.

1.3 Die Rho/Rac-Familie

1.3.1 Überblick

Die Zugehörigkeit zur Rho-Rac-Familie der kleinen G-Proteine wird definiert über das Vorhandensein einer Rho-Insert-Domäne. Diese aus 14 Aminosäuren bestehende Domäne hat Funktionen bei der Interaktion mit GDIs (Richman et al., 2004; Wu et al., 1997). Proteine, denen die Insertionsdomäne fehlt, können durch GDIs nicht mehr von der Zellmembran abgezogen werden. Die Rho-Insert-Domäne ist aber auch für die Aktivierung von einigen Effektoren wichtig. So konnte für Cdc42 gezeigt werden, dass die Deletion der Insert-Domäne zwar nicht die Interaktion mit der Phospholipase D1 stört, aber dennoch ihre Aktivierung verhindert (Walker and Brown, 2002; Walker et al., 2000).

Die Rho/Rac-Familie stellt einen der bestuntersuchten Zweige der Superfamilie der kleinen G-Proteine dar. Mitglieder der Familie wurden bisher in allen untersuchten eukaryotischen Zellen gefunden. Bisher wurden in Säugetieren 22 verschiedene Mitglieder der Familie nachgewiesen, die anhand von Sequenzdaten, Strukturmotiven und Funktion in fünf Subfamilien eingeteilt wird (Wennerberg and Der, 2004, Abb. 2-2): die RhoA-, die Rac1-, Cdc42-, die Rnd- und die RhoBTB-Subfamilie. Die am besten untersuchten Mitglieder, RhoA, Rac1 und Cdc42 sind vor allem an der Organisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt. Außerdem wurden Funktionen im Zellwachstum, im Vesikeltransport und der Zellpolarisation nachgewiesen (Takai et al., 2001). Rac1 hat zusätzlich Funktionen bei der Immunantwort von Makrophagen: Hier reguliert es die Bildung von reaktiven Sauerstoff-Verbindungen (Bokoch, 1995).

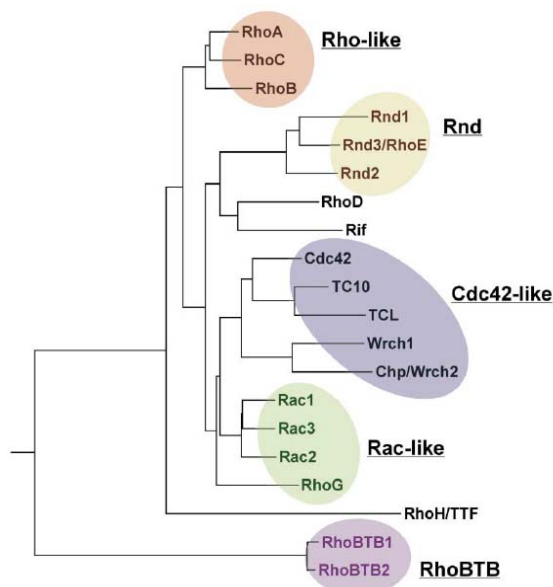


Abbildung 1-4: Die Rho/Rac-Familie der kleinen G-Proteine.

Das Dendrogramm verdeutlicht die Verwandtschaftsbeziehungen der Rho/Rac-Proteine. Als Grundlage dienen die Daten aus dem Sequenzvergleich der Rho-Domänen der einzelnen Proteine. Die farbigen Ellipsen markieren die einzelnen Subfamilien (Burridge and Wennerberg, 2004).

1.3.2 Das kleine G-Protein Cdc42

Cdc42 wurde ursprünglich als temperatursensitive Mutante in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* beschrieben (Adams et al., 1990; Johnson and Pringle, 1990). Die Mutante zeigt unter restriktiven Temperaturbedingungen einen Defekt in der Knospenbildung und arretiert als große Einzellzelle ohne Knospen. Die Kernteilung hingegen ist nicht betroffen. Es wurden delokalisierte, über die ganze Zellwand verteilte Chitinablagerungen entdeckt, während beim Wildtyp die Ablagerung im Knospungsprozess polar erfolgt. Später stellte sich heraus, dass es sich bei Cdc42 um ein ubiquitär verbreitetes eukaryotisches Protein handelt, das zur damals bereits bekannten Rho-Familie gehört. In der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* wurde ein zu Cdc42 homologes Protein durch Komplementation der temperatursensitiven Mutation in *S. cerevisiae* isoliert (Miller and Johnson, 1994). Der Phänotyp von Deletionsmutanten von *cdc42* in *S. pombe* unterscheidet sich deutlich von dem in *S. cerevisiae*: Die Zellen arretieren als kleine runde, einkernige Zellen. Der Einbau von neuem Zellwandmaterial in die Zellwand einer wachsenden Zelle fällt komplett aus. Auch hier ist *cdc42* ein essentielles Gen. Auch in höheren Organismen wurden Homologe von Cdc42 beschrieben: so zum Beispiel in *Caenorhabditis elegans* (Chen et al., 1993), der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, dem Huhn *Gallus gallus* (Gong et al., 1997) und der Maus *Mus musculus* (Gong et al., 1997). Diese Proteine zeigen alle eine Sequenzidentität von 80-95% zu Cdc42p aus *S. cerevisiae*. Auffallend ist, dass auch die Gene aus höheren Organismen die oben beschriebene temperatursensitive Mutante aus *S. cerevisiae* komplementieren können, was zeigt, dass die Funktionen von Cdc42 auch in verwandtschaftlich weit entfernten Organismen hoch konserviert sind. Im Menschen wurden ebenso wie in der Maus zwei Isoformen von *cdc42* entdeckt: Ein ubiquitär exprimiertes Gen *cdc42Hs* (Shinjo et al., 1990) und eine spezielle Isoform G25K (Munemitsu et al., 1990), die nur im Gehirn exprimiert wird.

In Fibroblasten führt die Injektion von konstitutiv aktivem Cdc42 zur Ausbildung von Filopodien (Kozma et al., 1995). Hierbei handelt es sich um zylinderförmige Zellausläufer, die unverzweigte Aktinbündel enthalten. Cdc42 beeinflusst also auch hier das Aktin-Zytoskelett. Dies geschieht über Interaktion mit dem Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein WASP (Rohatgi et al., 1999). Dieses aktiviert den Arp2/3-Komplex, der für die Aktin-Polymerisation verantwortlich ist. Humanes N-WASP enthält eine Cdc42-spezifische so genannte „Cdc42/Rac interactive binding“ (CRIB) - Domäne (Kolluri et al., 1996; Symons et al., 1996). Diese Domäne wirkt im ungebundenen Zustand autoinhibitorisch auf das WASP-Protein (Kim et al., 2000). Nach Bindung von Cdc42 aber wird diese Inhibition durch eine

Konformationsänderung aufgehoben und WASP kann mit Arp2/3 interagieren. Auch in *S. cerevisiae* wurde ein Homolog von WASP gefunden (Li, 1997). Allerdings fehlt diesem Protein namens Bee1p bzw. Las17p die CRIB-Domäne, sodass der Mechanismus des Zusammenspiels mit Cdc42p in diesem Organismus noch unklar ist.

In den meisten bisher untersuchten Organismen ist Cdc42 ein essentielles Protein. Allerdings konnte gezeigt werden, dass das Protein nicht essentiell für die Lebensfähigkeit von embryonalen Stammzellen der Maus ist (Chen et al., 2000). Zellen, in denen Cdc42 ausgeschaltet ist, zeigen normale Wachstumsraten. Für die embryonale Entwicklung der Maus hingegen ist das Protein absolut notwendig. In mehreren pilzlichen Organismen sind mittlerweile lebensfähige *cdc42*-Mutanten beschrieben worden: Die Deletion im humanpathogenen Pilz *Wangiella dermatitidis* führt nur zu geringen morphologischen Veränderungen, allerdings ist der Übergang von der Hefeform in die multizelluläre Form in der Mutante gestört. Im pflanzenpathogenen Pilz *Claviceps purpurea* ist Cdc42 ebenfalls nicht essentiell. Hier ist es allerdings wichtig für die vegetative Entwicklung und die Pathogenität (Scheffer et al., 2005). Auch in dieser Arbeit untersuchten pflanzenpathogenen Pilz *Ustilago maydis* ist *cdc42* nicht essentiell (vgl. Abschnitt 1.5.2).

1.3.3 Das kleine G-Protein Rac1

Rac1 wurde ursprünglich als Substrat für die ADP-Ribosylierung durch das C3-Toxin von *Clostridium botulinum* identifiziert (Didsbury et al., 1989). Daher leitet sich auch sein Name her (ras-related C3 botulinum toxin substrate). Allerdings wurde später gezeigt, dass die eigentlichen Substrate dieses Toxins eher Rho-Proteine sind und Rac nur sehr ineffizient ribosyliert wird (Menard et al., 1992). Die Funktionen von Rac1 und Cdc42 sind sehr ähnlich und wie Cdc42 sind die Rac-Proteine in Eukaryoten weit verbreitet und hoch konserviert. Interessanterweise fehlen Rac-Homologe allerdings sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *S. pombe*. Rac1 ist an der Organisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt, und die Injektion von konstitutiv aktivem Rac1 in Fibroblasten führt zur Ausbildung von Lamellipodien und „membrane ruffles“ (Ridley et al., 1992). Bei Lamellipodien handelt es sich um vorstehende flache Strukturen, die an der vorderen Kante von wandernden Zellen entstehen. Falten sich diese zurück, entstehen die wellenförmigen „membrane ruffles“. Diese Strukturen entstehen interessanterweise auch als Antwort auf die Anwesenheit von aktivem Ras (Bar-Sagi and Feramisco, 1986). Dem wirkt allerdings die Expression von konstitutiv inaktivem Rac

entgegen (Ridley et al., 1992), Rac wird hier also in einem Ras-abhängigen Signalweg aktiviert. Der Einfluss von Rac1 auf das Aktin-Zytoskelett erfolgt wie im Fall von Cdc42 über den Arp2/3-Komplex. Das Bindeglied zwischen diesen beiden Komponenten ist hier allerdings das WAVE/Scar-Protein, das ebenfalls zur WASP-Familie gehört (Machesky and Insall, 1998; Miki et al., 1998). Dieses Protein besitzt allerdings keine CRIB-Domäne und interagiert nicht direkt mit Rac1. Ein Modell für die Aktivierung von WAVE/Scar durch Rac ist das Vorhandensein eines zwischengeschalteten Adaptorproteins namens IRSp53 (Miki et al., 2000). Allerdings wurde gezeigt, dass dieses Protein vornehmlich Cdc42 bindet, weshalb man es eher als Effektor dieses G-Proteins einordnet (Govind et al., 2001; Krugmann et al., 2001). Ein anderes Modell beschreibt einen Komplex aus fünf Proteinen, der WAVE/Scar in einem inaktiven Zustand hält (Eden et al., 2002). Aktiviertes Rac führt zur Auflösung des Komplexes, wodurch WAVE/Scar frei wird und Arp2/3 aktivieren kann.

1.3.4 Cdc42 und Rac1 als Komponenten von Signalkaskaden

Wie in Abschnitt 1.2 bereits angedeutet, sind Cdc42 und Rac1 neben der Organisation des Aktin-Zytoskeletts auch an der Weiterleitung einer Vielzahl von Signalen beteiligt. Sie fungieren als Vermittler zwischen membranständigen Rezeptoren und den MAP-Kinase-Kaskaden. Die Vermittlung verläuft über die Aktivierung von „p21 activated kinases“, den PAKs (Zhang et al., 1995). Diese Proteine besitzen wie das bereits beschriebene WASP-Protein eine autoinhibitorische CRIB-Domäne (Abb.1-5). Die Interaktion mit Cdc42 oder Rac1 hebt die Autoinhibition auf und führt zur Aktivierung der Kinase. Die Kinase autophosphoryliert sich anschließend, wodurch der aktive Zustand des Proteins stabilisiert wird (Chong et al., 2001). Ein gut untersuchtes Beispiel für die Beteiligung von Cdc42 und Rac1 an Signalkaskaden ist die c-Jun-Kaskade, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 führt. Dieser Transkriptionsfaktor besitzt am N-Terminus seiner Untereinheit c-Jun-Phosphorylierungsstellen, die von der MAP-Kinase JNK erkannt werden (Derijard et al., 1994). Dass Cdc42 und Rac die Kinase JNK über eine MAP-Kinase-Kaskade aktivieren können, wurde in vielen unabhängigen Studien nachgewiesen (Bagrodia et al., 1995; Minden et al., 1995).

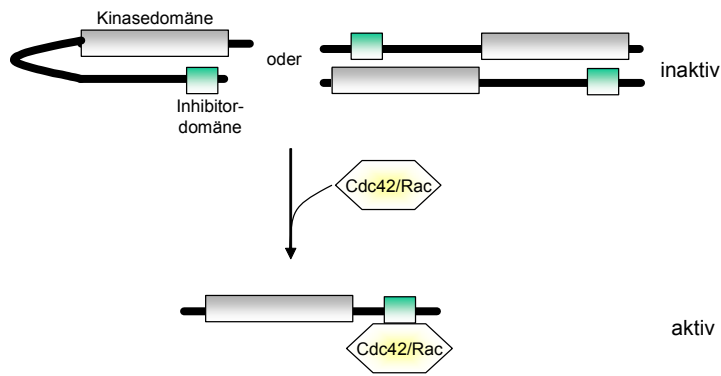


Abbildung 1-5:
Autoinhibitionsmechanismus
der PAK-Kinasen.

Die Kinasedomäne der PAK-Kinasen wird durch die Inhibitor-Domäne gehemmt. Bindung eines Rho/Rac-Proteins an die CRIB-Domäne, welche in der Inhibitor-domäne liegt, löst eine Konformationsänderung in dem Protein aus, die zur Freilegung der Kinasedomäne führt und deren Inhibition aufhebt.

Außerdem wurde gezeigt, dass dominant negatives Rac1 und dominant negatives Cdc42 die H-Ras-abhängige Aktivierung von JNK blockieren können (Arnould et al., 1998; Minden et al., 1995), was Cdc42 und Rac1 unterhalb von Ras in der Kaskade platziert. Das sich hieraus ableitende Modell des C-Jun Signalwegs weist deutliche Parallelen zu dem in Abschnitt 1.2 beschriebenen Signalweg in Hefe auf, der zum pseudofilamentösen Wachstum führt (Abb. 1-6). In beiden Fällen aktivieren membranständige Rezeptoren als Reaktion auf extrazelluläre Reize das G-Protein Ras. Dies führt über die Vermittlung eines von Ras aktivierten Rho/Rac-GEFs zur Aktivierung von Cdc42 oder Rac1. Über eine CRIB-Domäne interagieren diese G-Proteine nun mit einer PAK-artigen Kinase. Diese wiederum stimuliert eine MAP-Kinase-Kaskade, die zur Aktivierung eines Transkriptionsfaktors führt. Die Signalkaskaden sind also im Bereich der Eukaryoten hoch konserviert.

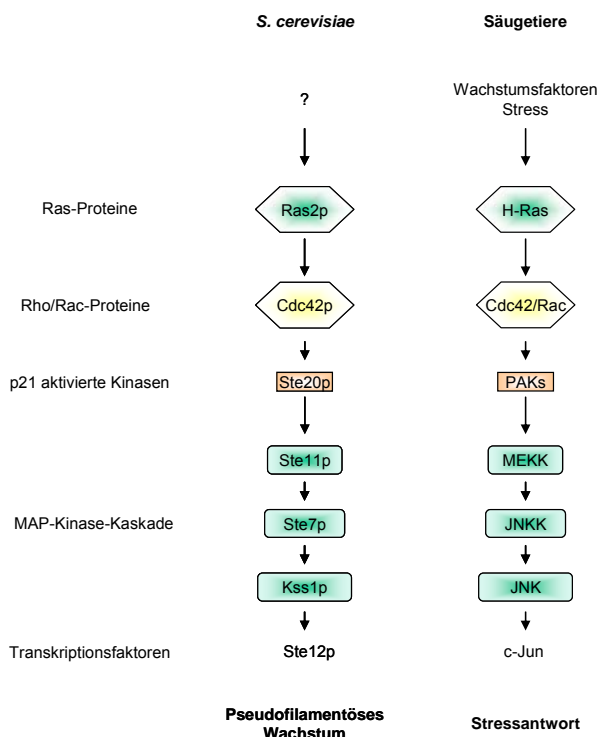


Abbildung 1-6: Die Rolle von Kleinen G-Proteinen der Rho/Rac-Familie in Ras-abhängigen Signalkaskaden von *S. cerevisiae* und Säugetieren.

Die Rho/Rac-GTPasen werden durch verschiedene Stimuli aktiviert und leiten das Signal über p21-aktivierte Kinasen an MAP-Kinase-Kaskaden weiter. Dies führt über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zur Expression spezifischer Gene (modifiziert nach Mösch et al., 1996).

1.4 *Ustilago maydis* als genetischer Modellorganismus

1.4.1 Überblick

Ustilago maydis gehört zur Ordnung der Brandpilze (*Ustilaginales*) im Phylum der Basidiomyceten. Brandpilze sind fakultativ biotrophe, pflanzenpathogene Schädlinge mit einem sehr engen Wirtsspektrum. Sie induzieren in ihren Wirten das Wachstum von Gallen oder Tumoren. Meist handelt es sich bei den Wirten um Getreide und Gräser. Daher verursachen Brandpilze häufig signifikante Ernteeinbußen, die von großer wirtschaftlicher Bedeutung sein können. Allerdings wird dies in einigen Teilen der Welt anders bewertet: So gelten die von *U. maydis* infizierten Maiskolben in Mexiko unter dem Namen Huitlacoche als Delikatesse (Ruiz-Herrera and Martinez-Espinoza, 1998). Das Wirtsspektrum einer einzelnen Art ist extrem begrenzt: *U. maydis* zum Beispiel befällt ausschließlich Mais und Teosinte, *Ustilago hordei* hingegen nur Gerste (Kahmann et al., 2000). Die meisten Brandpilze entwickeln sich in den Fruchtständen und ersetzen die Samen durch Ansammlungen schwarzer, wie verbrannt aussehender Teliosporen, die namensgebend für die Familie sind. Einige Arten, wie *U. maydis*, können alle oberirdischen Pflanzenteile infizieren (Abb. 1-7). Dort entwickeln sich dann Gallen, in denen der Pilz zu diploiden Teliosporen ausreift, aus denen sich beim Auskeimen durch Meiose haploide, saprophytische Sporidien bilden.

Bevor *U. maydis* die Pflanze infizieren kann, müssen die haploiden Sporidien mit einem Kreuzungspartner fusionieren. Die dadurch entstehenden dikaryotischen Zellen schalten ihr Wachstumsmuster um. Sie wachsen filamentös und sind in der Lage, den Wirt zu infizieren. Diese dimorphe Lebensweise macht *U. maydis* zu einem anerkannten Modellorganismus zur Untersuchung molekularer Prinzipien, die die Zellmorphologie organisieren und regulieren (Bölker, 2001). Molekularbiologische und genetische Methoden sind in *U. maydis* sehr gut etabliert und die Genomsequenz ist seit dem Jahr 2003 öffentlich zugänglich (http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/ustilago_maydis/).

1.4.2 Lebenszyklus

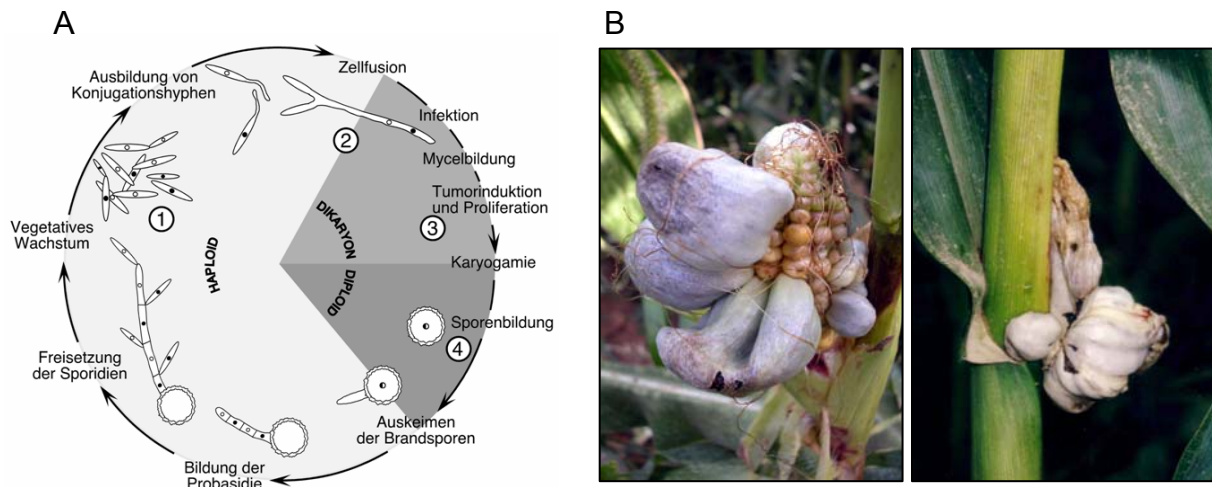


Abbildung 1-7: Der Lebenszyklus von *Ustilago maydis*.

A: Schematische Übersicht über den Lebenszyklus von *U. maydis*. Der dimorphe Pilz kann sich vegetativ und sexuell vermehren. In der vegetativen Phase vermehren sich die haploiden Sporidien hefeartig durch Knospung und ernähren sich saprophytisch. Die infektiöse Form ist filamentös und dikaryotisch. Sie entsteht durch die Fusion zweier kompatibler haploider Sporidien. In den von *U. maydis* in der Wirtspflanze induzierten Tumoren entwickeln sich die diploiden Sporen (aus Müller, 2003). B: Symptome einer Infektion von *Zea mays* durch *U. maydis*. Gezeigt ist die Bildung von Gallen am Kolben und am Stängel der Pflanze.

Haploide Sporidien von *U. maydis* sind in der Lage, sich asexuell durch hefeartiges Knospungswachstum zu vermehren. Für die Vollendung des sexuellen Lebenszyklus aber ist der Pilz auf seine Wirtspflanze Mais angewiesen: Pathogenität und sexuelle Vermehrung von *U. maydis* sind untrennbar verknüpft. Der sexuelle Lebenszyklus beginnt mit dem Aufeinandertreffen zweier haploider Sporidien, die sich in den beiden Kreuzungstypen *a* und *b* unterscheiden. Die Zellen erkennen einander über den Austausch von spezifischen Pheromonen. Hierdurch wird das normale Knospungswachstum eingestellt, und die Zellen bilden Konjugationsschläuche aus, die aufeinander zuwachsen. Dabei orientiert sich das Wachstum entlang des Pheromongradienten (Snetselaar et al., 1996). Durch Zellfusion entsteht eine dikaryotische Hyphe, die durch Septen von den Kreuzungspartnern abgetrennt wird (Snetselaar, 1993) und mit Hilfe appressorienartiger Strukturen oder durch natürliche Öffnungen wie Stomata in die Pflanze eindringt. In der Natur läuft der Kreuzungsprozess in der Regel auf der Oberfläche der Wirtspflanze ab, er kann aber unter Laborbedingungen auf Aktivkohleplatten nachvollzogen werden (Banuett and Herskowitz, 1994b; Day and Anagnostakis, 1973).

Innerhalb der Pflanze wächst der Pilz intra- und interzellulär (Banuett and Herskowitz, 1996). Nach etwa fünf Tagen induziert er die Entstehung von Gallen, die aus einer großen Anzahl vergrößerter Wirtszellen bestehen (Snetselaar and Mims, 1992). Der Pilz wächst nun interzellulär und bildet klammerartige Strukturen und Verzweigungen aus. Zu Beginn der Sporenbildung besteht das Pilzgewebe aus meist einkernigen Zellen, in denen kurz zuvor die Karyogamie stattgefunden hat. Die Zellen der sporogenen Hyphen trennen sich und bilden kürzere Fragmente und Einzelzellen (Banuett and Herskowitz, 1996), die in eine gelartige Masse eingebettet sind und in denen sich die diploiden Sporen entwickeln.

Die Teliosporen sind von einer dicken pigmentierten Zellwand umgeben und haben die Fähigkeit, mehrere Jahre im Ruhezustand zu überdauern. Eine Galle mittlerer Größe enthält etwa 200 Milliarden solcher Teliosporen (Christensen, 1963), welche nach dem Aufplatzen der Gallen durch den Einfluss von Wind und Regen verbreitet werden.

Unter geeigneten Bedingungen keimen die Teliosporen aus, wobei sie ein multizelluläres Promycel bilden, in dem die Meiose abläuft (Christensen, 1963). Die haploiden Kerne wandern dann in verlängerte Einzelzellen, die Sporidien. Diese wachsen saprophytisch und können sehr gut unter Laborbedingungen auf einfachen Kulturmedien gehalten werden. Sie zeigen polares Knospenwachstum und sind gut zugänglich für genetische Manipulationen. Die Kerne der Sporidien wandern bei der Knospung in die entstehende Tochterzelle ein und durchlaufen dort die Mitose. Daraufhin wandert ein Tochterkern zurück in die Mutterzelle (Snetselaar, 1993). Dies steht im Kontrast zu *S. cerevisiae*, wo der Kern die Mitose an der Grenze zwischen Mutterzelle und Knospe durchläuft.

1.4.3 Genetik des Kreuzungssystems

U. maydis besitzt ein tetrapolares Kreuzungssystem. Der biallelische *a*-Locus ist für die Erkennung eines Kreuzungspartners und die Zellfusion zuständig. Seine Gene kodieren für ein Pheromon/Rezeptor-System, bestehend aus dem Pheromon Mfa1 bzw. Mfa2, sowie den dazugehörigen Rezeptoren Pra1 bzw. Pra2 (Bölker et al., 1992). Die Mfa-Proteine tragen C-terminale Signalsequenzen für eine Prenylierung (CAAX), was auch bei vielen anderen pilzlichen Pheromonen der Fall ist. Die *pra*-Gene hingegen kodieren für Proteine mit hoher Sequenzähnlichkeit zu Ste3p, dem Pheromonrezeptor für den farnesylierten **a**-Faktor aus *S. cerevisiae*. Eine Fusion zweier Kreuzungspartner kann nur stattfinden, wenn sich die Partner im *a*-Locus unterscheiden. Während des Paarungsvorgangs senden beide Partner ihre

paarungstypspezifischen Pheromone aus und reagieren auf das Pheromon der Zellen des anderen Paarungstyps (Spellig et al., 1994). Der Zellzyklus wird arretiert und die Zellen bilden Konjugationshyphen, die entlang des Pheromongradienten aufeinander zu wachsen und schließlich an den Spitzen fusionieren (Snetselaar et al., 1996).

Nach der Fusion kommt der multiallelische *b*-Locus ins Spiel. Er ist entscheidend für die Selbst-/Nicht-Selbst-Erkennung der beiden nach der Zellfusion in einem gemeinsamen Zytoplasma vorliegenden Kerne. Nur wenn diese sich im *b*-Locus unterscheiden, kommt es zur Filamentierung der dikaryotischen Hyphe, die zur pathogenen Entwicklung fähig ist. Der *b*-Locus enthält zwei Gene, die in unterschiedliche Richtung transkribiert werden: *bEast* (*bE*) und *bWest* (*bW*). Jedes der beiden Genprodukte enthält eine zentrale Homeodomäne, die einen konstanten C-Terminus, der zwischen den einzelnen Allelen zu über 90% identisch ist, von einem divergenten N-Terminus trennt (Kronstad and Leong, 1990; Schulz et al., 1990). Die Aminosäuresequenzen der *bE*- und *bW*-Proteine zeigen hingegen untereinander mit Ausnahme der Homeodomäne kaum Sequenzhomologie. Die von den Genen *bE* und *bW* kodierten Proteine bilden durch Interaktion in einem N-terminalen Bereich, der sich über 100 Aminosäuren erstreckt, Heterodimere aus (Kämper et al., 1995). Dies funktioniert allerdings nur, wenn *bE* von einem anderen Allel stammt als *bW*. Hierfür müssen die Kreuzungspartner, aus denen der diploide Stamm hervorgeht, unterschiedliche *b*-Allele tragen. Die gebildeten *bW/bE*-Heterodimere wirken als Transkriptionsfaktoren der für die pathogene Entwicklung verantwortlichen Gene. Die Pathogenität von *U. maydis* wird also durch einen einzigen zentralen Genlocus kontrolliert.

Die genauere Untersuchung der Pheromonantwort förderte ein komplexes regulatorisches Netzwerk zu Tage, durch das *Ustilago maydis* auf verschiedene Umwelteinflüsse reagieren kann (Abb. 1-8). Ein Ausgangspunkt dieser Untersuchungen war die Beobachtung, dass ein Ausfall der cAMP-Signalkaskade zu filamentösem Wachstum führt (Gold et al., 1994). Außerdem wurde die α -Untereinheit eines G-Proteins, Gpa3, identifiziert, deren Deletion in Sterilität und einem Pathogenitätsverlust resultiert (Regenfelder et al., 1997). Ein dominant aktives Allel von Gpa3 versetzt haploide Zellen in die Lage, ohne Pheromonstimulation die Paarungsreaktion durchzuführen. Das Protein wurde aufgrund von Sequenzvergleichen und morphologischen Studien außerdem als Aktivator der Adenylatzyklase Uac1 identifiziert, was die Pheromonantwort mit dem cAMP-Signalweg verknüpft. Deletionsmutanten von *uac1* wachsen konstitutiv filamentös. Es konnte gezeigt werden, dass das von Uac1 gebildete cAMP die Proteinkinase A (PKA) aktiviert, indem es die regulatorische Untereinheit Ubc1 von der katalytischen Untereinheit Adr1 ablöst und diese so aktiviert. Hohe cAMP-Level oder

die Deletion von Ubc1 führen zur Ausbildung von sternchenförmigen Zellclustern (Gold et al., 1994). Wie die Deletion von *uac1* führt auch die Deletion von *adr1* zu filamentösem Wachstum und einem Paarungsdefekt (Dürrenberger and Kronstad, 1999). Die Suche nach Suppressoren dieses Phänotyps in den *uac1*-Mutanten förderte Mitglieder einer typischen MAP-Kinase-Kaskade zu Tage: Ubc4, Ubc5 und Ubc3. (Andrews et al., 2000; Dürrenberger and Kronstad, 1999). Hierbei steht *ubc* für „*Ustilago* *bypass of cyclase*“. Zwei dieser Proteine waren bereits zuvor als Mitglieder der Pheromonkaskade identifiziert worden (Ubc5 entspricht Fuz7 (Banuett and Herskowitz, 1994a), Ubc3 entspricht Kpp2 (Müller et al., 1999)), was die Verknüpfung des cAMP-Signalwegs mit der MAP-Kaskade in diesem Prozess unterstreicht.

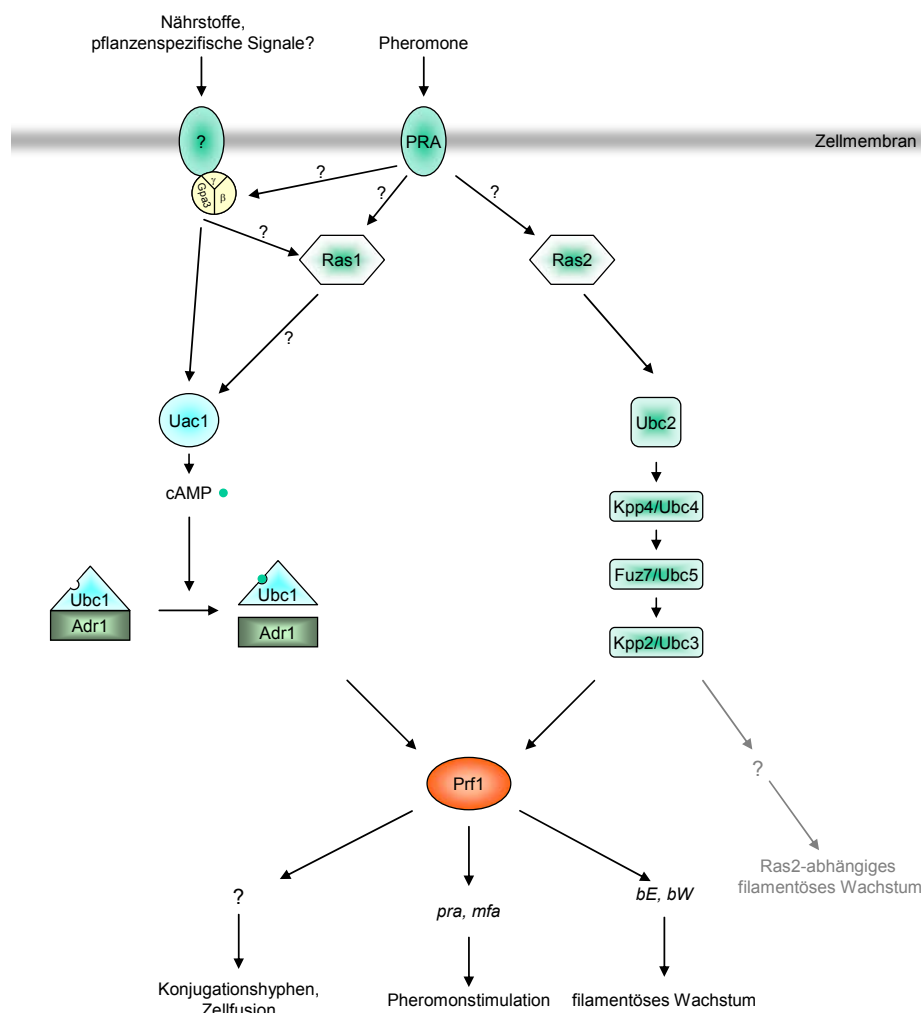


Abbildung 1-8: Regulatorische Signaltransduktion zur Steuerung der Kreuzung und der Pathogenität.

Zwischen dem cAMP-Signalweg und der MAP-Kinase-Kaskade bestehen enge Verbindungen, sodass verschiedene Umweltsignale integriert werden können. Die MAP-Kinase-Kaskade läuft über drei Kinasen. Der cAMP-Signalweg läuft über ein heterotrimeres G-Protein, welches die Adenylatzyklase Uac1 aktiviert. Dies aktiviert die cAMP-abhängige Proteinkinase Adr1 durch Dissoziation der regulatorischen Untereinheit Ubc1. Die Integration der verschiedenen Signale verläuft vor allem über den Transkriptionsfaktor Prf1, dessen Aktivität von beiden Kaskaden reguliert wird. In grau dargestellt ist das Ras2-abhängige filamentöse Wachstum, das nicht über Prf1 vermittelt wird.

Die Integration der beiden Signalwege erfolgt über den Pheromone Response Factor Prf1 (Hartmann et al., 1996). Dieser Transkriptionsfaktor reguliert die Expression der *a*- und der *b*-Gene. Er zeigt sowohl für PKA-abhängige als auch für MAP-Kinasen-abhängige Phosphorylierung passende Sequenzmotive und wird wohl durch beide Kaskaden aktiviert. Außerdem unterliegt seine eigene Expression einer positiven Rückkoppelung nach Pheromonstimulation. Interessanterweise führt auch die Expression eines konstitutiv aktiven Ras2-Proteins in *U. maydis* zu filamentösem Wachstum (Müller et al., 2003a). Außerdem konnte dieses kleine G-Protein in einem genetischen Screen nach Suppressoren des konstitutiv filamentösen Phänotyps einer *uac1*-Mutante isoliert werden (Lee and Kronstad, 2002). Diese Ergebnisse platzieren das Protein in diesem Netzwerk oberhalb von der MAP-Kinase-Kaskade, was dadurch unterstützt wird, dass mit Ubc2 ein Adapterprotein oberhalb dieser Kaskade isoliert werden konnte, das eine Ras-Interaktionsdomäne trägt (Mayorga and Gold, 2001). Für dominant aktives Ras1 hingegen wurde gezeigt, dass es die Pheromonexpression stimuliert, und zwar unabhängig von der MAP-Kinase-Kaskade. Dies führte zu der Ansicht, dass Ras1 eher über dem cAMP-Signalweg einzuordnen ist (Müller et al., 2003a). Die Rollen dieser beiden kleinen G-Proteine in *U. maydis* werden ausführlicher in Abschnitt 1.5.1 diskutiert.

1.5 Die Funktion von kleinen G-Proteinen in *Ustilago maydis*

1.5.1 Die Ras-Proteine

In *U. maydis* wurden zwei *ras*-Gene beschrieben, *ras1* und *ras2*. *ras1* enthält ein Intron, (Müller et al., 2003a), während der Leserahmen von *ras2* nicht unterbrochen ist. Die beiden Proteine zeigen eine Sequenzidentität von 48 % (Müller et al., 2003a). Ras1 zeigt eine hohe Sequenzidentität zu Ras1-Proteinen von anderen Organismen, zum Beispiel 79 % zu Ras1p aus *S. pombe* und 75 % zu Ras1p aus *S. cerevisiae*. Die Identität von Ras2 zu den Ras-Proteinen aus anderen Organismen ist etwas geringer. So zeigt es nur 56 % Identität mit Ras2p aus *S. cerevisiae* und 51 % mit Ras2 aus *Cryptococcus neoformans* (Müller et al., 2003a). Ras2 wurde unabhängig voneinander in zwei verschiedenen Gruppen isoliert (Lee and Kronstad, 2002; Müller et al., 2003a). Im ersten Fall wurde es in einem genetischen

Screen nach Suppressoren des filamentösen Phänotyps einer *adr1*-Mutante (vgl. Abb. 1-8) identifiziert. Das *ras2*-Gen befand sich auf einem Cosmid, das die Suppressormutante 33-1 komplementierte. Allerdings stellte sich heraus, dass es sich nicht wirklich um eine Komplementation handelte, sondern um eine Multikopie-Suppression. Die erhöhte Menge des Ras2-Proteins war also in der Lage, die Suppressormutante 33-1 zu supprimieren und das filamentöse Wachstum wiederherzustellen (Lee and Kronstad, 2002). Eine Deletion von *ras2* führt zu verkürzten rundlichen Zellen (Abb. 1-9). Die Expression von konstitutiv aktivem Ras2^{G16V} (Lee and Kronstad, 2002) oder Ras2^{Q65L} (Müller et al., 2003a) hingegen führt zu filamentösem Wachstum. Mehrere unabhängige Experimente deuten daraufhin, dass Ras2 diese Filamentbildung über die MAPK-Kaskade und nicht über den cAMP-Signalweg steuert: Die Expression von aktivem Ras2^{G16V} in einer *ubc1*-Mutante, in der der cAMP-Signalweg konstitutiv aktiv ist, führt zu einem Misch-Phänotyp (Lee and Kronstad, 2002): Die Zellen werden länger, zeigen aber an den Spitzen das für die *ubc1*-Mutante typische multiple Knospungsmuster. Die Filamentbildung verläuft also unabhängig vom cAMP-Weg. Die Expression des dominant aktiven Ras2^{G16V} in *fuz7*- oder *ubc3*-Mutanten, in denen die MAP-Kinase-Kaskade unterbrochen ist, führt hingegen nicht mehr zu filamentösem Wachstum (Lee and Kronstad, 2002), was zeigt, dass Ras2 das filamentöse Wachstum über die MAP-Kinase-Kaskade reguliert. Dies geschieht allerdings unabhängig vom Pheromon-Response-Faktor Prf1. Dies wird daraus ersichtlich, dass auch in *prf1*-Mutanten die Expression von Ras2^{G16V} zu filamentösem Wachstum führt.

Mit dem Protein Sql2 wurde auch ein GEF für Ras2 beschrieben (Müller et al., 2003a). Dieser wurde als Suppressor der glänzenden Kolonien einer *gpa3*-Mutante (vgl. Abb. 1-8) isoliert (Müller et al., 2003a). Die Deletion von *sql2* führt zu keinem morphologischen Defekt. Auch die Kreuzungsreaktion ist in diesen Mutanten nicht betroffen (Müller et al., 2003a). Die pathogene Entwicklung der Deletionsmutanten in Maispflanzen ist allerdings erheblich reduziert. Interessanterweise wird die Kreuzungsreaktion in *sql2*-Deletionsmutanten viel stärker als im Wildtyp durch die Anwesenheit von cAMP im Medium gestört. Die Überexpression von Sql2 führt zu einem ähnlichen filamentösen Wachstum wie bei Expression von dominant aktivem Ras2^{Q65L} (Müller et al., 2003a). Wie in diesem Fall kann auch hier die Filamentbildung nicht durch die Zugabe von cAMP unterdrückt werden, beide Stämme reagieren aber auf cAMP mit stärkerer Verzweigung und Krümmung der Zellen. Diese ähnlichen Effekte führen zu der Annahme, dass Sql2 ein GEF von Ras2 ist.

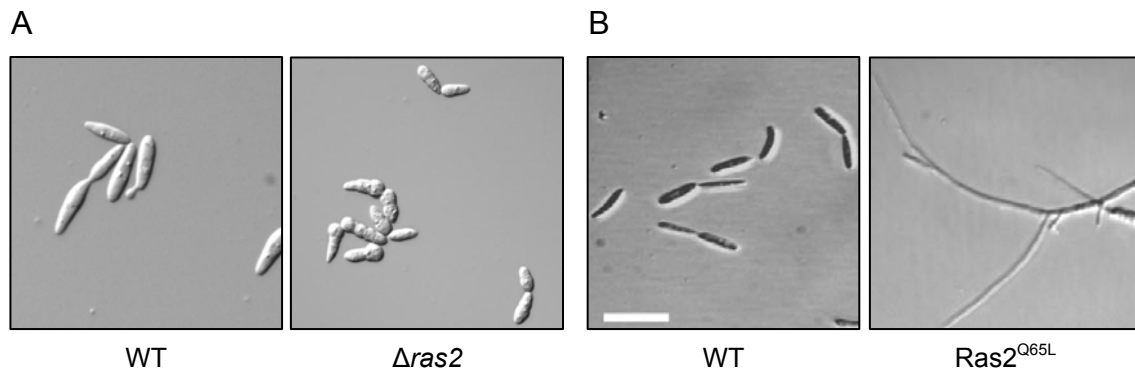


Abbildung 1-9: Einfluss von Ras2 auf die Zellmorphologie von *U. maydis*.

A: Vergleich der Zellmorphologie der *ras2*-Deletionsmutante mit dem Ausgangsstamm 518 (WT). Die Deletionsmutante zeigt deutlich rundere und kürzere Zellen (aus Lee and Kronstadt, 2002). B: Vergleich der Zellmorphologie von Zellen, die $Ras2^{Q65L}$ überexprimieren, mit dem Ausgangsstamm FB1 (WT). Die Expression von $Ras2^{Q65L}$ führt zu starker Filamentbildung der Zellen. Größenmarker: 20 μm (aus Müller et al., 2003a).

Im Gegensatz zu Ras2 scheint Ras1 in *U. maydis* keinen Einfluss auf die Morphologie der Zellen auszuüben. Die Expression von dominant aktivem $Ras1^{Q67L}$ führt zu keinen morphologischen Veränderungen (Müller et al., 2003a). Dies führte zu der Annahme, dass Sql2, dessen Überexpression in extremen morphologischen Veränderungen resultiert, kein Ras1-GEF ist. Der einzige Effekt, der nach der Expression von $Ras1^{Q67L}$ nachzuweisen war, ist ein extremer Anstieg der Expression des Pheromogens *mfal* (Müller et al., 2003a). Über die Analyse der Expression des Reportergens *frb34*, das nur in Anwesenheit von cAMP, nicht aber durch eine aktive MAPK-Kaskade positiv reguliert wird, konnte gezeigt werden, dass Ras1 die Pheromonexpression über den cAMP-Signalweg reguliert.

1.5.2 Die Proteine der Rho/Rac-Familie

In *Ustilago maydis* konnten vier Mitglieder der Rho/Rac-Familie der kleinen G-Proteine identifiziert werden: Cdc42, Rac1, Rho2 und Rho3 (Weinzierl et al., 2002). Die Inspektion der Genomsequenz allerdings zeigte, dass noch ein drittes Rho-Protein existiert (Rho1, Accession number EAK84804). Die Proteine zeigen alle signifikante Verwandtschaft zu ihren Homologen in anderen Organismen, so ist zum Beispiel Cdc42 zu 88 % identisch mit Cdc42p aus *S.cerevisiae* (Weinzierl et al., 2002), und Rac1 zeigt 79 % Identität zum menschlichen Rac1-Protein.

Von diesen fünf Proteinen wurde allerdings bisher nur Cdc42 genauer untersucht. Das Interesse für dieses Protein entstand durch die Analyse der Zelltrennung in *U. maydis*. Durch eine UV-Mutagenese wurden Mutanten, *don1* und *don3* isoliert, die nicht mehr in der Lage sind, die Zelltrennung zu vollenden (Weinzierl et al., 2002). Diese Mutanten zeigen im haploiden Zustand ein normales isotropes Expandieren der Knospe, und auch die Mitose und Verteilung der Tochterkerne auf die beiden Zellen läuft normal ab. Der letzte Schritt der Zytokinese ist allerdings gestört: Die Zellen trennen sich nicht voneinander und bilden in Flüssigmedium verzweigte „bäumchenartige“ Strukturen. Auch auf Festmedium sind die Mutanten leicht zu erkennen: Während Wildtypzellen hier gleichmäßige, kreisförmige Kolonien bilden, bilden die Mutanten kringelförmige Strukturen aus, die in der Mitte ein Loch aufweisen (Abb. 1-10). Dies gibt den Mutanten auch ihren Namen: *don* steht für „donut“ (englisch für „Kringel“).

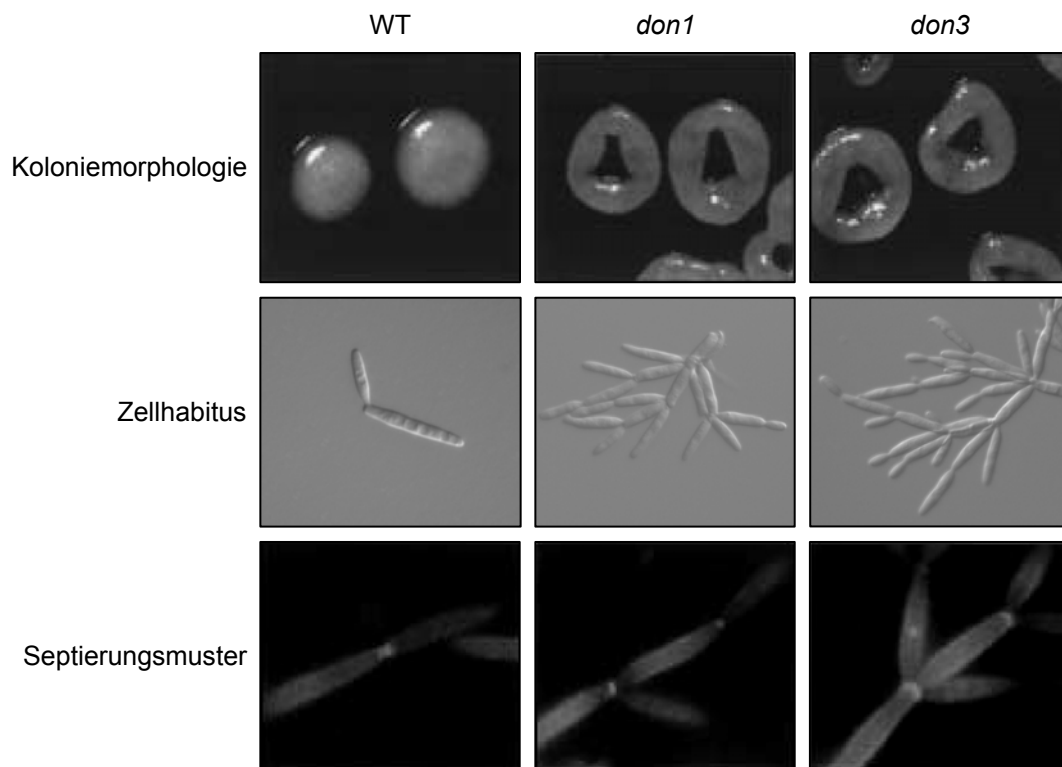


Abbildung 1-10: Phänotyp *don1*- und *don3*-Mutanten zeigen Defekte in der Zelltrennung.

Die *don1*- und *don3*-Mutanten bilden auf Festmedium im Gegensatz zum Wildtypstamm kringelförmige Kolonien und zeigen bei mikroskopischer Betrachtung einen deutlichen Defekt in der Zellseparation. Während der Wildtypstamm zwei Septen zwischen Mutter- und Tochterzelle bildet (in der untersten Zeile durch Färbung mit dem chitinspezifischen Farbstoff Calcofluor white gezeigt), wird bei den Mutanten nur eines gebildet (verändert nach Weinzierl et al., 2002).

Die Zelltrennung in *U. maydis* ist ein zweistufiger Prozess (Weinzierl et al., 2002): Im ersten Schritt wird ein primäres Septum an der Grenze zwischen Mutter- und Tochterzelle gebildet. An der Tochterseite dieses Septums lässt sich daraufhin eine deutliche Akkumulation membranöser Vesikel beobachten. Diese werden durch ein zweites Septum, das von der Tochterzelle gebildet wird, zwischen Mutter- und Tochterzelle eingeschlossen. Auf diese Weise entsteht eine Fragmentierungszone, und die Zellen werden zwischen den beiden Septen voneinander getrennt. Die *don*-Mutanten weisen einen Defekt in der Bildung des zweiten Septums auf (Abb. 1-10). Daher können sie keine Fragmentierungszone bilden und sich nicht mehr voneinander trennen.

Der Vergleich der Aminosäuresequenz von Don1 mit den in Datenbanken vorhandenen Proteinsequenzen deckte eine gewisse Ähnlichkeit dieses Proteins zum menschlichen Protein FGD1 und zu Frabin-Proteinen aus der Ratte auf. FGD1 ist das verantwortliche Gen für die Faciogenitale Dysplasie, auch Aarskog-Scott-Syndrom genannt (Pasteris et al., 1994). Frabin ist das homologe Protein der Ratte (Obaishi et al., 1998). Allerdings besitzt Frabin eine aktinbindende Domäne, die in Don1 und FGD1 nicht vorkommt. Die Proteine gehören zu der Dbl-Familie der „Guanine-Nucleotide-Exchange“-Faktoren (GEF), die spezifisch für kleine G-Proteine der Rho/Rac-Familie sind (Cerione and Zheng, 1996). Neben der GEF-Domäne enthalten diese Proteine eine Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH) und eine cysteinreiche FYVE-Zinkfingerdomäne. PH-Domänen binden spezifische Phospholipide wie Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat, was die Anheftung an die Zellmembran ermöglicht. Außerdem können sie für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich sein (Lemmon and Ferguson, 1998). Der FYVE-Zinkfinger hingegen ist essentiell für die Bindung von Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphat und kommt in vielen Proteinen vor, die an frühe Endosomen binden (Driscoll and Vuidepot, 1999; Fruman et al., 1999). Die Präsenz dieser beiden Domänen legt nahe, dass Don1 entweder mit der Plasmamembran assoziiert vorliegt (PH-Domäne) oder an frühe Endosomen bindet (FYVE-Zinkfinger). Da allerdings die Deletion der FYVE-Domäne zu einem funktionslosen Protein führt (Weinzierl et al., 2002), und diese Domäne somit essentiell für das Protein ist, ist eine Interaktion mit frühen Endosomen sehr wahrscheinlich.

Es konnte gezeigt werden, dass Don1 mit Cdc42 im Hefe-Zwei-Hybrid System interagiert, nicht aber mit den anderen kleinen G-Proteinen der Rho/Rac-Familie, Rho2, Rho3 und Rac1. Dies legt nahe, dass Don1 als spezifischer GEF für Cdc42 in *U. maydis* mit einer entscheidenden Funktion für die Bildung des sekundären Septums fungiert. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde *cdc42* deletiert (Mahlert, 2002). Der Phänotyp der *cdc42*-Deletionsmutante ähnelt dem der *don1*-Mutante sehr (vgl. Abb. 2-3). Auch hier ist die

Bildung des sekundären Septums gestört, sodass auch hier bäumchenartige Zellcluster entstehen. Wie die *don*-Mutanten bildet die *cdc42*-Deletionsmutante daher kringelförmige Kolonien auf Festmedium. Eine weitere wichtige Funktion kommt Cdc42 beim Paarungsprozess in *U. maydis* zu. So sind zwei kompatible Deletionsmutanten nicht in der Lage, miteinander zu fusionieren und ein dikaryotisches Mycel zu bilden. Ist *cdc42* allerdings in einem Partner noch vorhanden, so kann die Fusion stattfinden und das resultierende Dikaryon ist in der Lage, die pathogene Entwicklung zu durchlaufen. Überraschenderweise zeigen die *cdc42*-Deletionsmutanten bis auf den Zelltrennungsdefekt keine morphologische Auffälligkeit. Die Zellform der *cdc42*-Deletionsmutante ist vollkommen unverändert. Dies ist umso erstaunlicher, als in den meisten bisher untersuchten Organismen *cdc42* ein essentielles Gen ist und zumeist über die Regulation des Zytoskeletts einen großen Einfluss auf die Zellmorphologie hat.

Ein weiteres Mitglied der Signalkaskade, die zur Bildung des sekundären Septums führt, ist die oben erwähnte Proteinkinase Don3. Eine Deletion dieses Proteins führt ebenfalls zu dem beschriebenen Zelltrennungsdefekt (Weinzierl et al., 2002). Im Hefe-Zwei-Hybrid-System wurden schwache Interaktionen von Cdc42 und Don3 nachgewiesen (Weinzierl et al., 2002). Don3 gehört zur Familie der Germinal Center Kinasen (GCK). Diesen Kinasen fehlt im Gegensatz zu den Kinasen der PAK-Familie die CRIB-Domäne (Kyriakis, 1999). Dies spricht trotz der beobachteten schwachen Interaktion dafür, dass es sich bei Don3 nicht um einen direkten Effektor von Cdc42 handelt. Es ist wahrscheinlicher, dass Don3 Teil eines parallelen Signalweges ist, der an der Regulation der Zelltrennung beteiligt ist (Abb. 1-11).

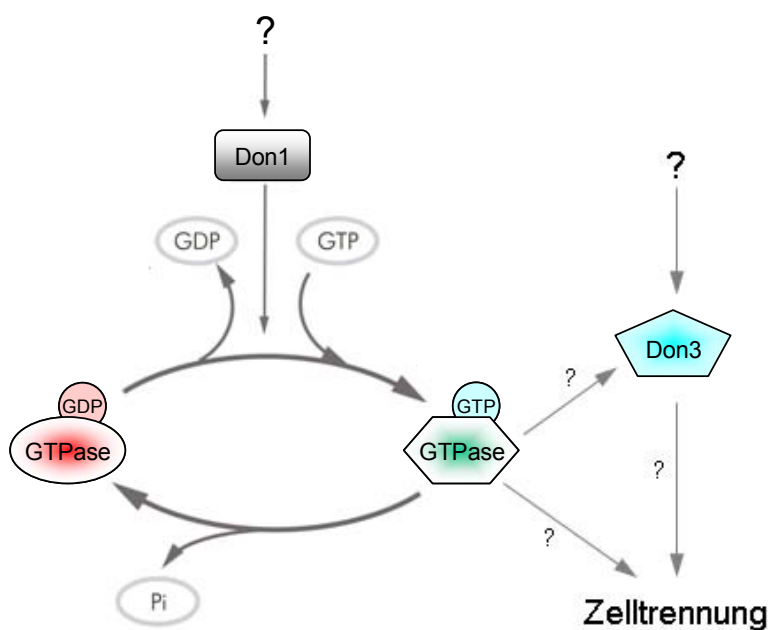


Abbildung 1-11: Die Don-Kaskade zur Regulation der Zellseparation in *Ustilago maydis*. Der GEF Don1 aktiviert Cdc42 durch Austausch von GDP gegen GTP. Dies führt zur Aktivierung von Effektoren, die die Zelltrennung gewährleisten. Ob Cdc42 hierbei direkt auf Don3 einwirkt, oder ob Don3 in einem parallelen Signalweg liegt, ist noch ungeklärt. Auch die Frage, durch welches Signal Don1 aktiviert wird, ist noch ungeklärt.

Dass Don3 in der Signalkaskade keinesfalls oberhalb von Cdc42 liegt, zeigt die Tatsache, dass die Expression einer konstitutiv aktiven Mutante von Cdc42 (Cdc42^{Q61L}) in *don1*-Mutanten den Wildtyp-Phänotyp wiederherstellt, während in *don3*-Mutanten keine Auswirkungen zu beobachten sind. Welche Signale diese Kaskade aktivieren und welche Regulatoren unterhalb von Don3 an der Regulation der Zellteilung beteiligt sind, ist noch unbekannt. Neben der GCK-Kinase Don3 existieren in *U. maydis* drei PAK-Kinasen: Cla4, Smu1 (das Ste20-Homolog von *U. maydis*) und Skm1. Von diesen wurden bisher nur Cla4 (Leveleki et al., 2004) und Smu1 (Smith et al., 2004) genauer untersucht. Cla4 ist an der Regulation der Zellmorphologie beteiligt. Die Deletion der Kinase führt zu unförmigen Zellen, die sich nicht mehr durch Knospung, sondern durch Abschnürung an einem zentral lokalisierten Septum teilen (Leveleki et al., 2004). In diesen Mutanten wird Chitin delokalisiert über die ganze Zelle verteilt in die Zellwand eingelagert, was für einen Defekt in der Organisation der Zellpolarität spricht. Eine weitere Funktion kommt Cla4 im Paarungsprozess zu: Zwei kompatible Kreuzungspartner, in denen *cla4* deletiert wurde, können nicht fusionieren. Interessanterweise ist auch die Fusion einer *cla4*-Deletionsmutante im *a1*-Hintergrund mit einem kompatiblen Wildtypstamm gestört, im umgekehrten Fall aber liegt keine Störung vor. Die Ursache für dieses Phänomen ist noch ungeklärt. Da die Deletion von Cla4 einen deutlich anderen Phänotyp zeigt als die Deletion von Cdc42, die auf die Zellmorphologie überhaupt keine Auswirkung hat, ist es unwahrscheinlich, dass Cla4 in *U. maydis* nur von Cdc42 aktiviert wird. Das Protein liegt vermutlich auch unterhalb eines anderen G-Proteins der Rho/Rac-Familie, das größeren Einfluss auf die Zellmorphologie hat. Das Ste20-Homolog von *U. maydis* wurde unter dem Namen Smu1 (*Ste20p affecting mating in Ustilago*) beschrieben (Smith et al., 2004). Die Deletion des Gens resultiert weder in veränderten Wachstumsraten noch in einer auffälligen Kolonimorphologie. Auch die Zellmorphologie zeigt keine Abweichungen im Vergleich zum Wildtyp (B. Sandrock, unveröffentlicht, vgl. Abb. 2-22). Allerdings sind die Deletionsmutanten stark im Paarungsverhalten beeinträchtigt (Smith et al., 2004). Ähnlich wie in den *cla4*-Mutanten ist aber auch hier die Beeinträchtigung abhängig vom genetischen Hintergrund, interessanterweise ist der Fall hier aber genau umgekehrt: *smu1*-Deletionsstämme, die den *a1*-Locus tragen, sind deutlich weniger im Kreuzungsverhalten beeinträchtigt als *smu1*-Deletionsstämme, die den *a2*-Locus enthalten. Diese Beobachtungen decken sich mit Ergebnissen von Expressionsanalysen in den Mutanten: die Transkription des Pheromongens *mfa2* ist in *a2 b2 Δsmu1*-Zellen deutlich reduziert, die Expression von *mfa1* in *a1 b1 Δsmu1*-Zellen jedoch nicht. Smu1 hat also Funktionen in der Regulation der Expression von *mfa2*.

1.6 Zielsetzung

Die Deletion von Cdc42 in *Ustilago maydis* zeigt einen überraschend schwachen Phänotyp. Die Zellmorphologie ist nicht verändert, es tritt lediglich ein Defekt in der Zelltrennung und im Kreuzungsverhalten auf. Dies gab den Anlass, die Funktionen anderer kleiner G-Proteine in *U. maydis* genauer zu analysieren. Ein Schwerpunkt sollte dabei auf der Charakterisierung von Rac1 liegen. Dieses G-Protein zeigt die höchste Verwandtschaft mit Cdc42. Daher war anzunehmen, dass Rac1 teilweise redundante Funktionen zu Cdc42 ausübt und dies für den milden Phänotyp der *cdc42*-Deletionsmutante verantwortlich ist.

Außerdem sollte die Charakterisierung der kleinen G-Proteine auf die Ras-Familie ausgeweitet werden. Durch ein besseres Verständnis dieser beiden Proteinfamilien sollte das bestehende Bild der regulatorischen Netzwerke in *U. maydis* ergänzt und vertieft werden. *U. maydis* bietet sich mit seiner dimorphen Lebensweise und seiner genetischen Handhabbarkeit als Modellorganismus für die Untersuchung der Regulation der Zellmorphologie an. So können hier wertvolle Erkenntnisse über die verschiedenen Aufgaben der kleinen G-Proteine und ihr Zusammenspiel gewonnen werden.

Für die Untersuchung der Funktionen der Proteine sollten Deletionsstämme und konditionale Stämme, in denen die Expression des Gens selektiv reguliert werden kann, hergestellt werden. Außerdem sollten konstitutiv aktive Allele der G-Proteine hergestellt werden. Die zellbiologische Charakterisierung der Mutanten sollte Aufschluss über die Funktion der jeweiligen Proteine und ihre Stellungen im regulatorischen Netzwerk geben. Die Bezüge der regulatorischen Proteine untereinander sollten durch die Charakterisierung von Mehrfachmutanten genauer analysiert werden.

2 Ergebnisse

2.1 Deletion von *rac1* in *U. maydis*

2.1.1 Konstruktion einer *rac1*-Deletionsmutante

Die Auswirkungen einer Deletion von *cdc42* auf die Zellmorphologie sind im Vergleich zur Situation in *S. cerevisiae* und *S. pombe* überraschend gering. Außer dem beobachteten Zelltrennungsdefekt sind keine weiteren Phänotypen sichtbar. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Existenz eines Rac-Proteins in *U. maydis*. Die Sequenz von Rac1 ist zu 66,8 % mit der von Cdc42 identisch (Abb. 2-1) und so könnte Rac1 teilweise die Funktionen dieses Proteins übernehmen.

		20	40	60	80	100	
Cdc42	1	MQTIKCVVVDGAVGKTCLLISYTNKFPSEYVPTVFDNYAVTVMIGEDPYTLGLFDTAGQEDYDRLRPLSYPQTDVFLVCFSVTSPASFENVKEKWFPE	100				
		20	40	60	80	100	
Rac1	1	MQTIKCVVVDGAVGKTCLLISYTNKFPSEYVPTVFDNYAVTVMIGEDPYTLGLFDTAGQEDYDRLRPLSYPQTDVFLVCFSVTSPASFENVKEKWFPE	100				
		20	40	60	80	100	
Cdc42	101	VHHHCPGVPCILVGTQVLDLDDHAVIEKLARKQRPVFPFAGERLARELGAVKYVECSALTQKGLKNVDFDEAIVAALEP-PVIRKKSK-CAIL	191				
		20	40	60	80	100	
Rac1	101	VSHHAPNIPTILVGTQVLDLDDHAVIEKLARKQRPVFPFAGERLARELGAVKYVECSALTQKGLKNVDFDEAIVAALEP-PVIRKKSK-CAIL	193				
		20	40	60	80	100	

Identität: 66,8 % (129/193 AS)

Abbildung 2-1: Sequenzvergleich von Cdc42 und Rac1 aus *U. maydis*.

Die beiden Proteine haben einen sehr ähnlichen Aufbau und zeigen auf Aminosäureebene eine Sequenzidentität von 66,8 Prozent.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde zunächst eine *rac1* Deletionsmutante in *U. maydis* konstruiert, indem durch homologe Rekombination der offene Leserahmen (ORF) von *rac1* durch eine Nourseothricin (NAT)-Resistenzkassette ersetzt wurde. Zu diesem Zweck wurde ein Konstrukt erstellt, in dem die NAT-Kassette von den *rac1* flankierenden Sequenzen umgeben ist (Abb. 2-2). Die beiden Flanken wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und zusammen mit der Resistenzkassette in den Vektor pSL1180 kloniert (siehe Methodenteil), um das Plasmid pRac1ΔNat zu erhalten. Das Konstrukt wurde in linearisierter Form in *U. maydis* eingebracht und die entstandenen Transformanten auf die korrekte Deletion von *rac1* überprüft. Hierfür wurde die genomische DNA der Kandidaten und eines Wildtypstammes mit PstI und BamHI geschnitten und durch Southern Blot analysiert. Als Sonde diente ein 513 bp großes PstI-Fragment aus der linken Flanke von *rac1* (Abb. 2-2). Während im Wildtyp ein PstI-BamHI-Fragment der Größe von 989 bp zu erwarten war, sollte dieses Fragment durch das Vorhandensein einer zusätzlichen PstI-

Schnittstelle zwischen der linken Flanke und der NAT-Kassette im Deletionskonstrukt bei korrekter Integration auf eine Größe von 570 bp reduziert werden. Bei ektopischer Integration des Deletionskonstrukts waren beide Größen zu erwarten. Die Deletion von *rac1* konnte bei drei Kandidaten bestätigt werden.

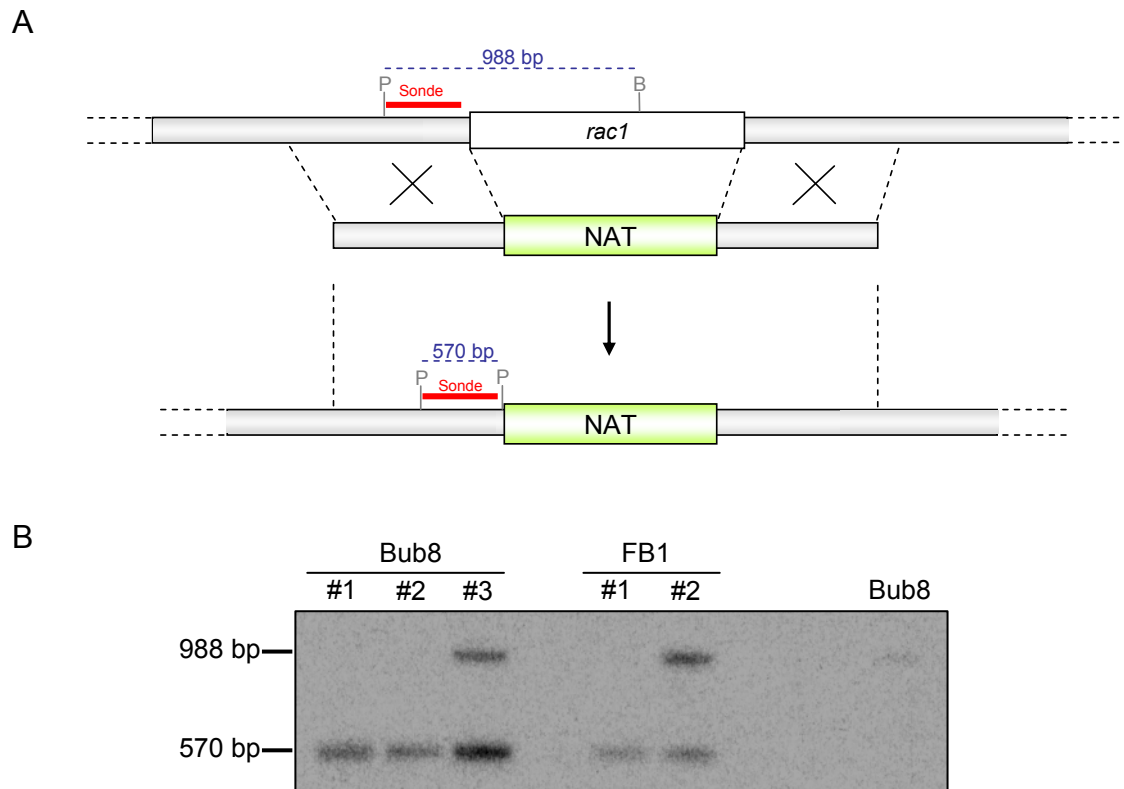


Abbildung 2-2: Konstruktion von *rac1*-Deletionsmutanten in *Ustilago maydis*.

A: Der offene Leserahmen von *rac1* wurde mittels homologer Rekombination durch eine NAT-Resistenzkassette ersetzt. Hierfür wurde ein Konstrukt erstellt, in dem die NAT-Resistenzkassette von den den *rac1*-ORF flankierenden Sequenzen umgeben ist. In rot ist die Sonde dargestellt, die zur Analyse der Transformanten benutzt wurde. Die blau gestrichelten Linien deuten die Fragmente an, die im Wildtyp und in der Deletionsmutante im Southern Blot nach Restriktion mit PstI (P) und BamHI (B) durch die Sonde markiert werden.

B: Die Southern-Analyse zeigt die für die Deletion erwarteten Banden der Größe 570 bp in Klon Bub8 #1 und #2 sowie in Klon FB1 #1. Die erwartete Bande von 989 bp im Wildtypstamm Bub8 tritt ebenfalls auf. Klon Bub8 #3 und FB1 #2 zeigen ein für ektopische Integration typisches Bandenmuster.

2.1.2 *rac1*-Deletionsmutanten weisen Defekte in der Zellmorphologie auf

Die Morphologie der *rac1* Deletionsmutanten unterscheidet sich erheblich von der Morphologie von Wildtypzellen. Die Zellen sind deutlich breiter und die Zellpole sind abgerundet (Abb. 2-3). Außerdem fiel bei der mikroskopischen Analyse auf, dass die Zellteilung nach einem komplett anderen Mechanismus verläuft. Wildtypzellen vermehren

sich in der hefeartigen Form durch Knospung. Die Tochterzellen trennen sich nach Ablauf der Mitose an einer von zwei Septen begrenzten Fragmentierungszone (O'Donnell and McLaughlin, 1984; Weinzierl et al., 2002). In $\Delta rac1$ -Mutanten dagegen erfolgt die Zellteilung durch Abschnürung an einem zentral gelegenen Septum. Um die Unterschiede in der Cytokinese sichtbar zu machen, wurden die Stämme mit dem chitinspezifischen Fluoreszenzfarbstoff Calcofluor white gefärbt, der die Septen von *U. maydis* effizient markiert. Diese Färbung zeigt deutlich, dass die Abschnürung in den Deletionsmutanten im Gegensatz zum Wildtyp an einem Einzelseptum in der Zellmitte stattfindet.

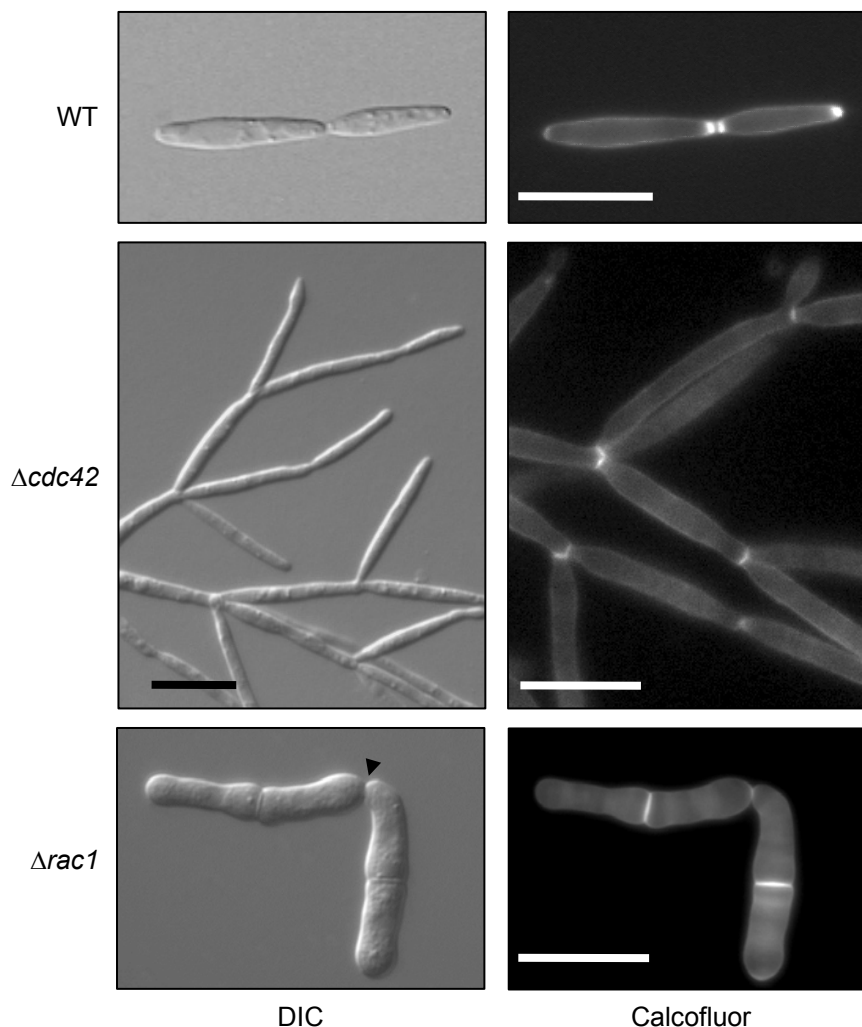


Abbildung 2-3: Zellmorphologie der *rac1*-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtypstamm Bub8 und zur *cdc42*-Deletionsmutante.

Gezeigt sind DIC-Aufnahmen und Calcofluor-white-Färbungen der drei Stämme. Die *rac1*-Mutante zeigt deutliche Anomalien in der Zellmorphologie. Die Zellen sind dicker und ihre Pole runder als im Wildtyp. Während die *cdc42*-Mutante lediglich einen Defekt in der Ausbildung des sekundären Septums zeigt und daher in der Zellseparation blockiert ist, ist in der *rac1*-Mutante das normale Knospenwachstum völlig blockiert. Stattdessen bilden die Zellen hier ein zentral lokalisiertes Septum, an dem es später zur Zelltrennung durch Einschnürung kommt (▲). Der Maßstab entspricht einer Länge von 10 μM .

Der normale Knospungsvorgang ist in den Deletionsmutanten also weitgehend blockiert und wird von einem anderen Mechanismus abgelöst. Dies zeigt, dass Rac1 eine entscheidende Rolle bei der Knospung von *U. maydis* spielt. Eine ganz ähnliche Form der Zellteilung wurde bereits in Stämmen beobachtet, in denen das Gen für die Proteinkinase Cla4 deletiert ist (Leveleki et al., 2004).

Um herauszufinden, ob Rac1 eine Rolle bei der Kernverteilung spielt, wurde in die Deletionsmutante ein kernlokalisiertes GFP-Protein eingebracht. Das hierfür benötigte Konstrukt pGonc-cbx-eGFP-NLS wurde von Gero Steinberg zur Verfügung gestellt und enthält eine C-terminale GFP-Fusion eines Kernlokalisierungssignals (NLS) (Straube et al., 2001). Abbildung 2-4 zeigt die Verteilung der Kerne in verschiedenen Stadien des Zellzyklus der Deletionsmutante. Es konnte keine Anomalie in der Verteilung der Kerne zwischen den Zellen festgestellt werden. Dies zeigt, dass Rac1 keinen Einfluss auf die Verteilung der Kerne zwischen Mutter- und Tochterzelle hat. Interessanterweise sieht man während der Mitose allerdings hantelförmige Kernstrukturen, was darauf hindeutet, dass es in *rac1*-Deletionsmutanten trotz der für *U. maydis* beschriebenen offenen Mitose (Straube et al., 2005) nicht zu einem Zerfall der Kernhülle kommt.



Abbildung 2-4: Visualisierung der mitotischen Kernteilung in *rac1*-Deletionsmutanten.

Die Abbildung zeigt die Lokalisation der Zellkerne in verschiedenen Stadien des Zellzyklus. Die Zellkerne wurden durch GFP-Fusion an ein Kernlokalisierungssignal sichtbar gemacht.

2.1.3 *rac1*-Deletionsmutanten zeigen Defekte im Kreuzungsverhalten

Kompatible Zellen von *U. maydis* können auf aktivkohlehaltigen Agarplatten fusionieren und bilden anschließend ein dikaryotisches Luftmycel. Diese Tatsache kann für einen einfachen Kreuzungstest ausgenutzt werden. Hierfür wurden Flüssigkulturen der zu kreuzenden Stämme direkt gemischt und dann auf eine Aktivkohleplatte aufgetropft.

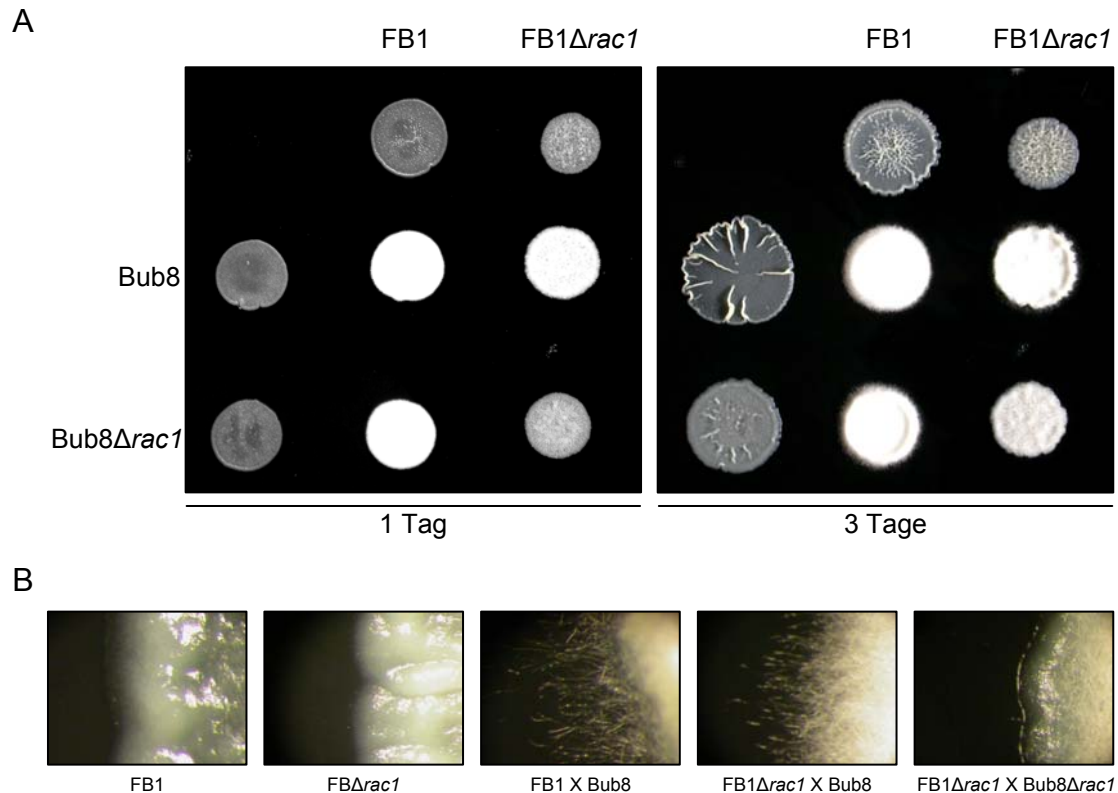


Abbildung 2-5: Kreuzungstest der *rac1*-Deletionsmutanten.

Übernachtskulturen der Stämme wurden in den angegebenen Kombinationen im Verhältnis 1:1 gemischt und auf aktivkohlehaltige PD-Platten getropft. A: Koloniemorphologie nach einem bzw. drei Tagen Wachstum. Weiße filzige Kolonien entstehen nach einer positiven Paarungsreaktion. B: Vergrößerte Aufnahme der Ränder der Kolonien nach drei Tagen Wachstum. Die Kolonien, die von Stämmen gebildet werden, die ohne Kreuzungspartner aufgetropft wurden, sind sehr glatt und glänzend. Stämme, bei denen eine Kreuzungsreaktion stattgefunden hat, bilden sehr filzige Kolonien, von denen sich Filamente über den Kolonierand hinaus auf die Platte erstrecken. Die Kolonie, die nach Kreuzung von zwei *rac1*-Deletionsstämmen gebildet wurde, hat hingegen einen deutlich glatteren Rand. Die Filamente wachsen nicht über den Kolonierand hinaus auf der Platte, sondern es bilden sich nur Lufthyphen in der Mitte der Kolonie.

Stämme, die ein Mycel bilden, erscheinen auf einer solchen Platte als weiße filzige Kolonien. Stämme, die nicht fusionieren können oder anschließend kein Mycel bilden können, bilden stattdessen dunklere, glatte Kolonien. Das Ergebnis des Tests ist in Abbildung 2-5 gezeigt. Die Kombination der beiden Wildtypstämme FB1 (*al b1*) und Bub8 (*a2 b4*) und die beiden Kombinationen eines Wildtypstammes mit dem kompatiblen Deletionsstamm führen schon

nach einem Tag zu mycelartigem Wachstum. Die Kombination aus den beiden Deletionsstämmen hingegen zeigt nach einem Tag noch keine Hinweise auf eine Kreuzungsreaktion. Nach drei Tagen wird allerdings auch hier die Kolonie heller und erscheint filzig. Allerdings unterscheidet sie sich deutlich von den anderen Kolonien (Abb. 2-5b). Während normalerweise nach einer positiven Kreuzungsreaktion sehr lange Filamente gebildet werden, die auch über den Kolonierand hinaus auf der Aktivkohleplatte wachsen, bleibt der Kolonierand bei Abwesenheit von *rac1* in beiden Kreuzungspartnern glatt und glänzend. Hier bilden sich nur in der Mitte der Kolonie Mycelstrukturen, die von der Plattenoberfläche weg in die Luft ragen. Dies spricht dafür, dass bei Abwesenheit von Rac1 zwar eine Zellfusion stattfinden kann, dass aber die anschließende *b*-abhängige Filamentbildung gestört ist. Rac1 ist also für die Zellfusion entbehrlich, hat aber einen Einfluss auf die Filamentbildung nach der Zellfusion.

2.2 Rac1 reguliert das filamentöse Wachstum

2.2.1 Überexpression von *rac1* induziert filamentöses Wachstum

Die Ergebnisse des Kreuzungstests und der veränderten Zellmorphologie sprechen dafür, dass Rac1 am polaren Zellwachstum und der Filamentbildung beteiligt sein könnte. Um diese Funktion genauer zu untersuchen, sollte das Rac1-Protein in Wildtypzellen überexprimiert werden. Hierfür wurde das Konstrukt pRU11ΔNotI-Rac1 hergestellt, in dem *rac1* unter der Kontrolle des *crg*-Promotors steht. Dieser Promotor ist in Anwesenheit von Glukose reprimiert, in Anwesenheit von Arabinose hingegen stark induziert. Über das auf dem Vektor vorhandene Allel des *ip*-Gens, das Resistenz gegen Carboxin (Cbx) vermittelt, wurde der Vektor durch homologe Rekombination spezifisch in den genomischen *ip*-Locus eingebracht (Loubradou et al., 2001). Um zu verdeutlichen, dass es sich bei dem *ip*-Locus um den für die Cbx-Resistenz verantwortlichen Locus handelt, wird dieser in dieser Arbeit auch *cbx*-Locus genannt. Die korrekte Integration in den *cbx*-Locus wurde mittels PCR überprüft. Die Transformanten wurden in YNB-Medium in Anwesenheit von 2 % Glukose (YNB-G) angezogen und anschließend in YNB-Medium, das 2 % Arabinose enthielt (YNB-A), überführt, um die Expression von *rac1* zu induzieren.

Die einsetzende Überexpression von *rac1* führt bereits nach 90 Minuten zu starken morphologischen Umwandlungen (Abb. 2-6). Statt der Ausbildung einer Knospe beginnen die Zellen ein langes Filament zu formen, das vom Zellpol aus entspringt. Das Filament erinnert stark an das Filament, das in der dikaryotischen Phase des Lebenszyklus von *U. maydis* gebildet wird und von der Expression des heterodimeren Homeodomänen-Transkriptionsfaktors bE/bW abhängig ist (Kämper et al., 1995). Dieses *b*-abhängige Filament kann durch Überexpression eines aktiven bW/bE-Heterodimers auch im haploiden Zustand induziert werden. Der Stamm AB31 trägt ein aktives bW2/bE1-Heterodimer unter Kontrolle des *crg*-Promotors (Brachmann et al., 2001). Induktion auf arabinosehaltigem Medium führt in diesem Stamm zur Filamentbildung. Um die Anlage des Rac1-abhängigen Filaments mit der des *b*-abhängigen zu vergleichen, wurden beide Typen mit Calcofluor white gefärbt. Dadurch sollten die charakteristischen Septen sichtbar gemacht werden, die im *b*-abhängigen Filament gebildet werden.

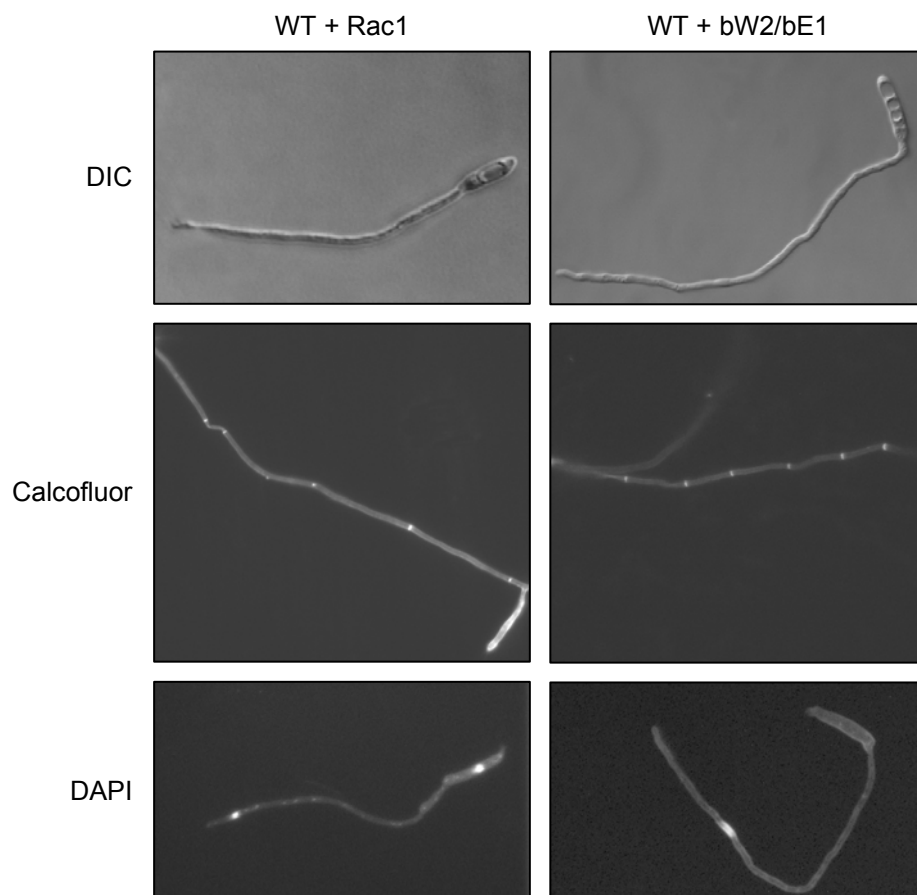


Abbildung 2-6: Vergleich des *b*-abhängigen mit dem Rac1-abhängigen Filament.

Die beiden Stämme wurden 12 Stunden nach Induktion der Expression von *rac1* bzw. *bW2* und *bE1* mit Calcofluor white und DAPI gefärbt, um das Septierungsmuster und die Kernverteilung zu untersuchen. Das Septierungsmuster ist in beiden Fällen sehr ähnlich. Die Kernverteilung jedoch weist Unterschiede auf: Während bei *b*-Induktion der Zellzyklus stoppt und ein einzelner Kern ins Filament einwandert, bleibt bei Rac1-Überexpression ein Kern in der Zelle zurück und der Tochterkern wandert in das Filament ein.

Diese Septen bleiben im distalen Teil des wachsenden Filaments zurück, wenn die wachsende Spitze von der kollabierenden Hyphe abgetrennt wird (Steinberg et al., 1998). Ein ähnliches Septierungsmuster konnte durch die Färbung auch im *Rac1*-abhängigen Filament gezeigt werden (Abb. 2-6). Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Hyphen ist allerdings zu beobachten: Bei Überexpression des bW2/bE1 Heterodimers kommt es zum Zellzyklusarrest und der Zellkern wandert in das Filament ein (Abb. 2-6). Die Anfärbung der Zellkerne mit dem in die DNA interkalierenden Fluoreszenzmarker DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) zeigt jedoch, dass im Falle der Überexpression von *rac1* ein Zellkern in der Mutterzelle zurückbleibt, während ein zweiter in das Filament einwandert. Die Überexpression von *rac1* führt also nicht zum Zellzyklusarrest. Nach der Mitose bleibt der Mutterkern in der Zelle zurück und nur der Tochterkern wandert in das Filament ein.

Das Ausbleiben des Zellzyklusarrests führt zu einem deutlichen Unterschied im Wachstumsverhalten der beiden Stämme: Während bei Überexpression des bW2/bE1 Heterodimers pro Zelle nur ein Filament entsteht, sind die *rac1* überexprimierenden Zellen in der Lage, mehr als ein Filament zu formen. Das zweite Filament folgt dem ersten zeitlich verzögert nach (Abb. 2-7, Movie 1).

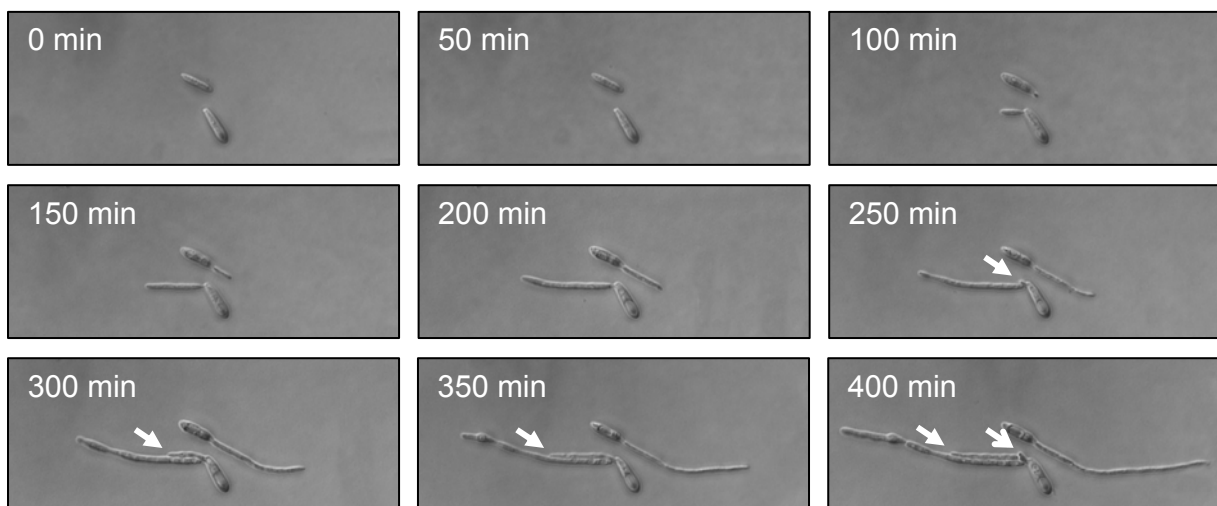


Abbildung 2-7: Auswirkungen der Überexpression von *rac1* auf die Zellmorphologie.

Die Überexpression von *rac1* unter der Kontrolle des *crg*-Promotors wurde durch Überführen der Zellen auf YNB-A-Medium induziert. Anschließend wurden die Zellen auf mit YNB-A-Agarose beschichtete Objektträger überführt. Bereits nach etwa 100 Minuten beginnen die Zellen mit der Ausbildung langer Filamente, die sich anstelle einer Knospe an einem Zellpol formen. Die Zellen sind in der Lage, an diesem Zellpol noch weitere Filamente auszubilden, was hier nach 250 und 400 Minuten zu beobachten ist. Die Zeitangaben in der Abbildung beziehen sich auf die verstrichene Zeit nach Induktion. Die Pfeile markieren das zweite und das dritte Filament. Siehe auch Movie 1.

In jedes dieser Filamente wandert ein Kern ein, der aus einer mitotischen Teilung des Kerns in der Mutterzelle hervorgeht. Nach der nächsten Kernteilung wird erneut ein Filament gebildet, in das der Tochterkern einwandert. Jedes der Filamente enthält daher einen Kern (Abb. 2-8).

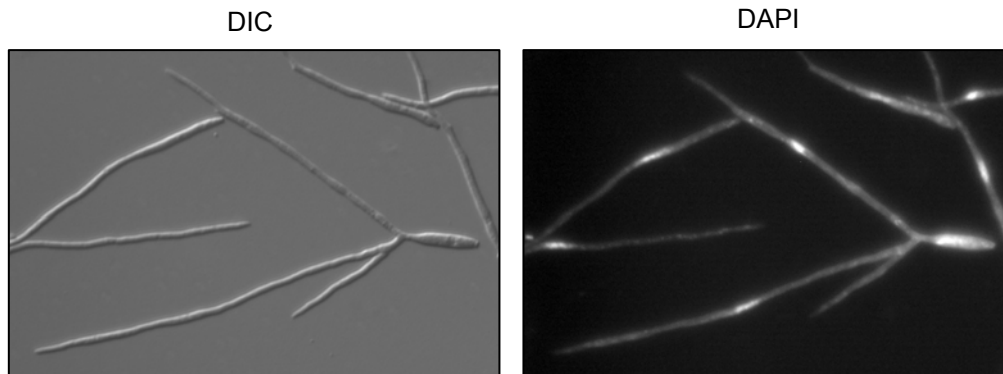


Abbildung 2-8: Kernverteilung in Rac1-induzierten Filamenten.

Zellen, die *rac1* unter Kontrolle des *crg*-Promotors exprimieren, wurden sechs Stunden nach Induktion mit DAPI gefärbt, um die Kerne sichtbar zu machen. Die Mutterzelle enthält einen Kern. Außerdem wandert in jedes von ihr gebildete Filament ein Kern ein.

2.2.2 Rac1 ist notwendig für die b-abhängige Filamentbildung

Die Ähnlichkeit des Rac1-abhängigen Filaments mit dem b-abhängigen Filament und die Tatsache, dass im Kreuzungstest auf Aktivkohleplatten in Abwesenheit von Rac1 die Filamentbildung gestört ist, legten die Vermutung nahe, dass Rac1 für die b-abhängige Filamentbildung benötigt werden könnte. Um den Einfluss von Rac1 auf das b-induzierte Filament zu untersuchen, wurden Deletionsmutanten von *rac1* im Stamm AB31 konstruiert, der das aktive bW2/bE1 Heterodimer unter Kontrolle des regulierbaren *crg*-Promotors trägt (Brachmann et al., 2001).

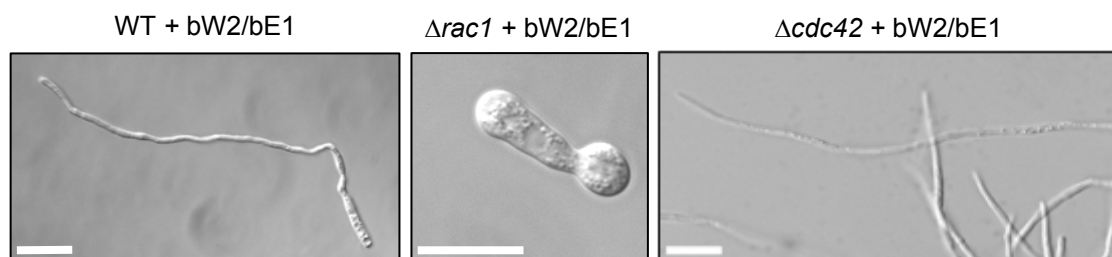


Abbildung 2-9: Rac1 reguliert die Ausbildung des dikaryotischen Filaments.

Die Expression des bW2/bE1 Heterodimer wurde durch Wachstum in Anwesenheit von Arabinose in den Stämmen AB31 (WT), AB31 Δ *rac1* und AB31 Δ *cdc42* induziert. Die daraus resultierende Filamentbildung konnte zwar im Wildtyphintergrund und im *cdc42*-Deletionsstamm, nicht jedoch im *rac1*-Deletionsstamm beobachtet werden. Der Maßstab entspricht einer Länge von 10 μ M.

Wie oben beschrieben, führt Induktion auf arabinosehaltigem Medium in diesem haploiden Stamm normalerweise zur Filamentbildung. Dabei kommt es zu einem Zellzyklusarrest und der Kern wandert in das Filament ein. (Abb. 2-9). Interessanterweise stoppen zwar *rac1*-Deletionsmutanten in AB31 unter induzierenden Bedingungen ebenfalls den Zellzyklus, die Filamentbildung aber bleibt aus. Dies zeigt, dass Rac1 für die Ausbildung des *b*-induzierten Filaments essentiell ist. Eine Deletion von *cdc42* in AB31 hingegen hat keine Auswirkung auf die Filamentbildung, was zeigt, dass Cdc42 hierbei keine Rolle spielt. Die Anwesenheit von Rac1 ist also notwendig für die Ausbildung des *b*-abhängigen filamentösen Wachstums und die Überexpression des Proteins ist ausreichend, um Filamentbildung zu induzieren.

2.2.3 *rac1*-Deletionsmutanten sind apathogen

Da die Filamentbildung von *U. maydis* für die Pflanzeninfektion eine entscheidende Rolle spielt, wurden die *rac1* Deletionsmutanten in Pathogenitätsstudien getestet. Hierfür wurden kompatible Kreuzungspartner in den in Tabelle 2-1 angegebenen Kombinationen gemischt und mit einer Spritze in eine Woche alte Maispflanzen injiziert. Die Maispflanzen wurden zwei Wochen lang im Gewächshaus gehalten und auf Krankheitssymptome hin untersucht. Es zeigte sich, dass *rac1*-Mutanten in Kombination mit einem kompatiblen Wildtypstamm weiterhin infektiös sind (Tab. 2-1). Dies belegt, dass beide Deletionsstämme noch in der Lage sind, mit Wildtypstämmen zu fusionieren, um das infektiöse Dikaryon zu bilden. Werden allerdings Kombinationen verwendet, in denen *rac1* in beiden Stämmen fehlt, führt dies zum vollständigen Verlust der Pathogenität (Tab. 2-1). Um zu entscheiden, ob der Pathogenitätsverlust auf einen Defekt bei der Kreuzungsreaktion zurückzuführen ist, oder ob Rac1 auch eine Rolle in der pathogenen Entwicklung nach der Zellfusion spielt, wurde das Gen ebenfalls im solopathogenen Stamm SG200 (Bölker et al., 1995) deletiert. Dieser haploide Stamm enthält eine aktive Kombination von *a*- und *b*-Allelen und ist daher in der Lage, ohne vorherige Zellfusion Maispflanzen zu infizieren. Interessanterweise ist auch in diesem Stammhintergrund die *rac1*-Deletionsmutante nicht in der Lage, Krankheitssymptome in der Maispflanze auszulösen. Dies zeigt, dass Rac1 für die pathogene Entwicklung nach der Zellfusion essentiell ist.

Tab. 2-1: Pathogenitätstest.

Stämme¹⁾	Infizierte Pflanzen	Pflanzen mit Tumor
FB1 x Bub8	8	7 (88%)
FB1 Δ <i>rac1</i> x Bub8	8	6 (75%)
FB1 x Bub8 Δ <i>rac1</i>	8	5 (63%)
FB1 Δ <i>rac1</i> x Bub8 Δ <i>rac1</i>	85	0 (0%)
FB1 Δ <i>cdc42</i> x Bub8	8	6 (75%)
FB1 x Bub8 Δ <i>cdc42</i>	8	3 (38%)
FB1 Δ <i>cdc42</i> x Bub8 Δ <i>cdc42</i>	86	0 (0%)
SG200	39	35 (90%)
SG200 Δ <i>rac1</i>	40	0 (0%)
SG200 Δ <i>cdc42</i>	40	0 (0%)

¹⁾ Bei FB1 und Bub8 handelt es sich um Wildtypstämme mit den Genotypen *alb1* und *a2b4*. SG200 ist ein solopathogener Stamm mit dem Genotyp *al::mfa2 bW2 bE1*.

Für Cdc42 war bereits bekannt (Mahlert et al., 2006), dass eine Kreuzung zweier Deletionsmutanten apathogen ist. Um auch für dieses G-Protein die Rolle während der pathogenen Entwicklung zu studieren, wurde ebenfalls eine Deletion von *cdc42* in SG200 durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass auch Cdc42 für die pathogene Entwicklung essentiell ist (Tab. 2-1).

2.3 Dominant aktives Rac1^{Q61L} wirkt letal

2.3.1 Überexpression von *rac1*^{Q61L}

Um die Wirkung von Rac1 in *U. maydis* näher zu untersuchen, sollte eine dominant aktive Version des Proteins hergestellt werden. Es wurde an Cdc42 in Hefe gezeigt, dass der Austausch von Glutamin an Position 61 zu Leucin zu defekter GTPase-Aktivität führt, sodass das Protein konstitutiv im GTP-gebundenen Zustand vorliegt (Ziman et al., 1991). Durch Austausch des Glutamins an Position 61 in Rac1 von *U. maydis* zu Leucin wurde nun ein Allel hergestellt, dass für das konstitutiv aktive Protein Rac1^{Q61L} kodiert, und auf die gleiche

Art wie das Wildtyp-Allel in den Vektor pRU11 Δ NotI kloniert und in *U. maydis* eingebracht. So kann es unter Kontrolle des *crg*-Promotors überexprimiert werden.

Die Induktion der aktiven Version von Rac1 hat drastische Auswirkungen auf die Zellen (Abb. 2-10, Movie 2). Unmittelbar nach der Induktion wird das Knospenwachstum eingestellt und die Zellen beginnen, sich an einem Zellpol aufzublähen. Es entwickeln sich sehr große Vakuolen, die zumeist fusionieren und sich vornehmlich an einem Zellpol ansammeln. Die Zellwand hält der anormalen Volumenzunahme häufig nicht stand, sodass die Zellen nach etwa sieben Stunden platzen (nicht gezeigt). Die Markierung der Zellwand mit rhodamingekoppeltem „Wheat Germ Agglutinine“ (WGA) zeigt an, dass das Aufblähen von massivem Zellwandwachstum begleitet wird (Abb. 2-11). Dies könnte aber auch auf intensive Reparaturarbeit an der belasteten Zellwand hinweisen.

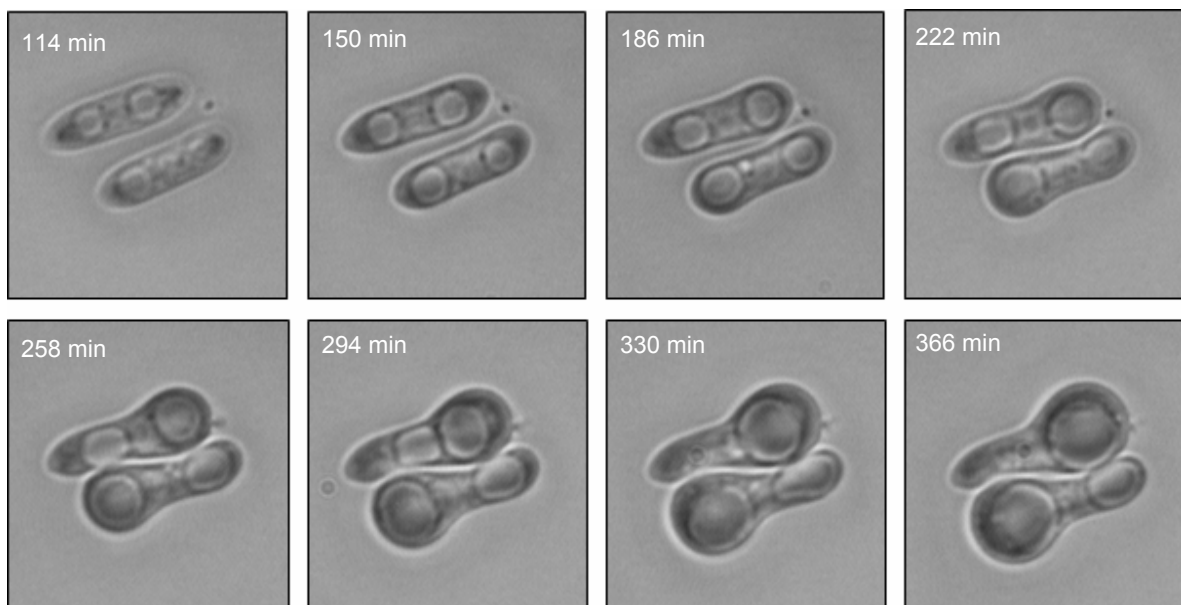


Abbildung 2-10: Morphologische Auswirkungen von dominant aktivem Rac1^{Q61L}.

Die Überexpression von Rac1^{Q61L} wurde durch Überführen einer Übernachtskultur in arabinosehaltiges Medium induziert. Anschließend wurden die Zellen auf einen mit YNB-A-Agarose beschichteten Objektträger überführt. Die Veränderungen der Zellmorphologie wurden über mehrere Stunden mikroskopisch verfolgt. Die angegebenen Zeitpunkte beziehen sich auf die nach Induktion vergangene Zeit.

Um zu testen, ob das Aufblähen und die Vakuolisierung ein Effekt eines aktiven Wachstumsprozesses bzw. einer massiven Flüssigkeitsaufnahme durch stimulierte Endocytose ist, oder eher ein durch Zellwanddestabilisierung und Turgordruck hervorgerufener passiver Effekt, wurde die Expression von *rac1*^{Q61L} auch unter Bedingungen hoher Osmolarität verfolgt. Hierfür wurden die Zellen in YNB-A-Medium, das zusätzlich 1 M Sorbitol enthielt, überführt. Unter diesen Bedingungen prägte sich der gleiche Phänotyp in der gleichen Geschwindigkeit aus (nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass die Expression von *Rac1*^{Q61L} eine massive Vakuolisierung unabhängig von den osmotischen Verhältnissen hervorruft.

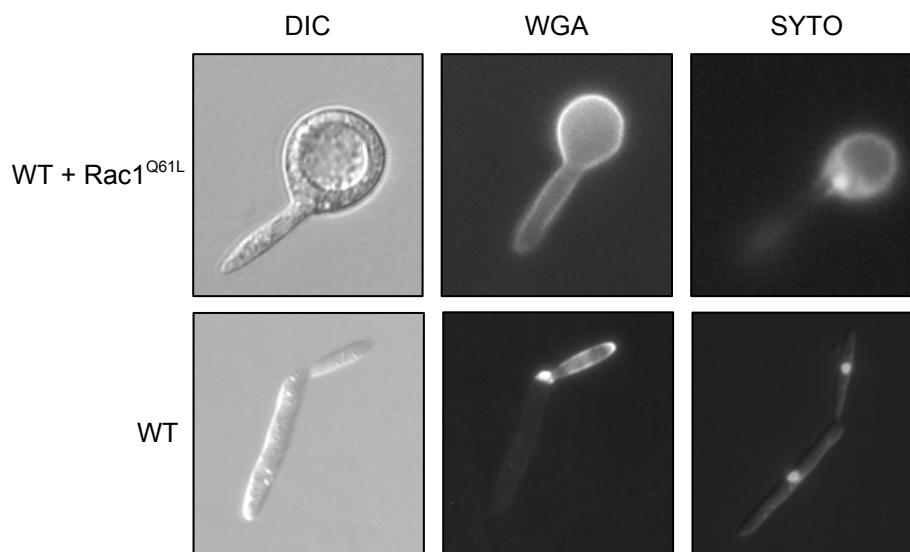


Abbildung 2-11: *Rac1*^{Q61L} führt zum Zellzyklusarrest.

Gezeigt sind die Zellwandfärbung durch WGA sowie die Kernfärbung durch SYTO11 bei *Rac1*^{Q61L} überexprimierenden Zellen und beim Wildtyp. Das Aufblähen der *Rac1*^{Q61L} überexprimierenden Zellen ist von massivem Einbau neuen Zellwandmaterials begleitet. Die Kernfärbung zeigt, dass der Zellzyklus durch *Rac1*^{Q61L} im einkernigen Stadium angehalten wird.

Die Färbung der Zellkerne der *rac1*^{Q61L} überexprimierenden Zellen zeigte, dass der Zellzyklus unter diesen Bedingungen arretiert wird. Die Kernteilung wird gestoppt und die Zellen verharren mit einem einzelnen Kern (Abb.2-11). Aktives *Rac1* induziert also nicht nur die Vakuolisierung der Zelle, sondern greift auch in den Zellzyklus ein.

2.3.2 Das polare Wachstum ist in *rac1*-Deletionsmutanten gestört

Die Tatsache, dass Rac1 einen so starken Einfluss auf die Filamentbildung von *U. maydis* hat, spricht dafür, dass dieses Protein an der Regulation des polaren Wachstums der Zellen beteiligt ist. In den letzten Jahren hat sich das Verständnis der Polarisierung von Zellen um ein neues Konzept erweitert: Es wurden Mikrodomänen in den Zellmembranen beschrieben, die reich an Sphingolipiden und Ergosterolen sind und die Plasmamembran kompartimentalisieren. Man geht davon aus, dass diese sogenannten *lipid rafts* einen entscheidenden Einfluss auf die Zellpolarität und die Zellkommunikation haben (Rajendran and Simons, 2005). Zur mikroskopischen Visualisierung dieser Membrandomänen wird der Fluoreszenzfarbstoff Filipin eingesetzt (Wachtler et al., 2003). Dieses Polyen-Antibiotikum formt spezifische Komplexe mit freien 3- β -Hydroxysterolen. In *S. pombe* konnte gezeigt werden, dass *lipid rafts* an Stellen des polarisierten Wachstums lokalisieren. Filipin färbt hier sowohl die wachsenden Zellpole als auch während der Zellteilung die Region um das zentrale Septum (Wachtler et al., 2003). Auch in den hefeartig wachsenden Zellen des Humanpathogens *C. neoformans* lokalisieren *lipid rafts* an den Stellen polarisierten Wachstums: Hier markiert Filipin vor allem die Knospenspitzen und die Septen (Nichols et al., 2004).

Um das Wachstumsmuster der *rac1*-Deletionsmutante mit der des Wildtyps zu vergleichen, wurden beide Stämme mit Filipin gefärbt. Dabei zeigte sich, dass das Wachstumsmuster der Deletionsmutante sich deutlich von dem des Wildtyps unterscheidet: In beiden Fällen wird der wachsende Zellpol deutlich mit Filipin gefärbt (Pfeile in Abb. 2-12). In *rac1* Deletionsmutanten aber kehrt sich das Färbungsmuster während der Septierung um: Anstatt am Zellpol befindet sich der Farbstoff nun in einer breiten Region auf einer Seite des sich neu bildenden Septums. Dieses Markierungsmuster deutet auf die Wachstumsprozesse hin, die zur Abschnürung der beiden Zellen voneinander nötig sind. Im Wildtyp werden in dieser Phase des Zellzyklus noch immer die Knospenspitze sowie beide frisch gebildeten Septen von Filipin markiert. Hier ist keine Kontraktion der Zellen nötig, da die Zelltrennung in der Fragmentierungszone erfolgt (Weinzierl et al., 2002).

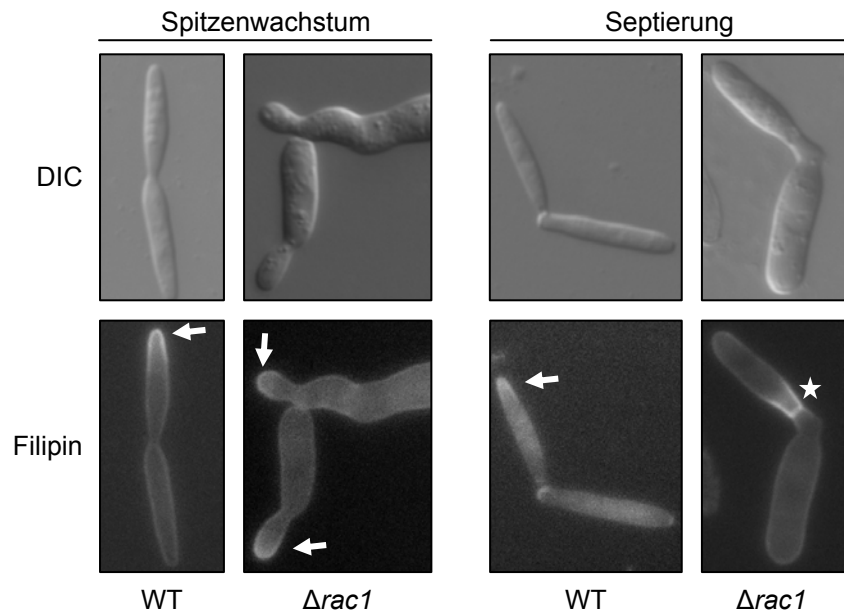


Abbildung 2-12: Visualisierung von sterolreichen Membrandomänen.

Sterolreiche Membrandomänen wurden durch Markierung mit Filipin sichtbar gemacht. In Wildtypzellen und *rac1* Deletionsmutanten färbt Filipin den wachsenden Zellpol (Pfeil). Während der Septierungsphase ist im Wildtyp noch immer die Spitze der wachsenden Knospe mit Filipin markiert, und beide Septen werden sichtbar. In der *rac1* Deletionsmutante dagegen färbt Filipin während der Septierungsphase eine breite Region auf einer Seite des Septums (Stern).

2.4 Cla4 ist ein Effektor von Rac1

2.4.1 *cla4*-Deletionsmutanten bilden kein *rac1*-abhängiges Filament

Der morphologische Phänotyp der *rac1*-Deletionsmutante ähnelt sehr dem der bereits beschriebenen *cla4*-Deletionsmutante (Leveleki et al., 2004). Cla4 gehört zur Familie der p21-aktivierten Kinasen (PAK). Die Aktivität dieser Kinasen wird durch kleine G-Proteine der Rho/Rac-Familie reguliert (Sells and Chernoff, 1997), was durch die konservierte Cdc42/Rac1-Interaktions- und Bindedomäne (CRIB) der Kinasen vermittelt wird. Ebenso wie *rac1*-Deletionsmutanten haben *cla4*-Deletionsmutanten in *U. maydis* eine rundere Zellform und teilen sich durch Abschnürung an einem zentralen Septum (Abb. 2-13). Cla4 aus *U. maydis* ist im Hefe-Zwei-Hybrid-System in der Lage, sowohl mit Cdc42 als auch mit Rac1 zu interagieren (Leveleki et al., 2004). Die vergleichbare Zellmorphologie der Deletionsmutanten spricht dafür, dass Cla4 ein potentieller Effektor von Rac1 ist. Deshalb lag

die Annahme nahe, dass Rac1 das polare Wachstum über eine Aktivierung der PAK-Kinase Cla4 steuert. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde das *rac1*-Überexpressionskonstrukt in einen *cla4*-Deletionsstamm eingebracht. Anschließend wurde die Expression durch Wachstum in arabinosehaltigem Medium induziert. Tatsächlich blieb die Rac1-abhängige Filamentbildung unter diesen Bedingungen aus (Abb. 2-13). Dies zeigt, dass Rac1 die Filamentbildung über die Aktivierung von Cla4 organisiert.

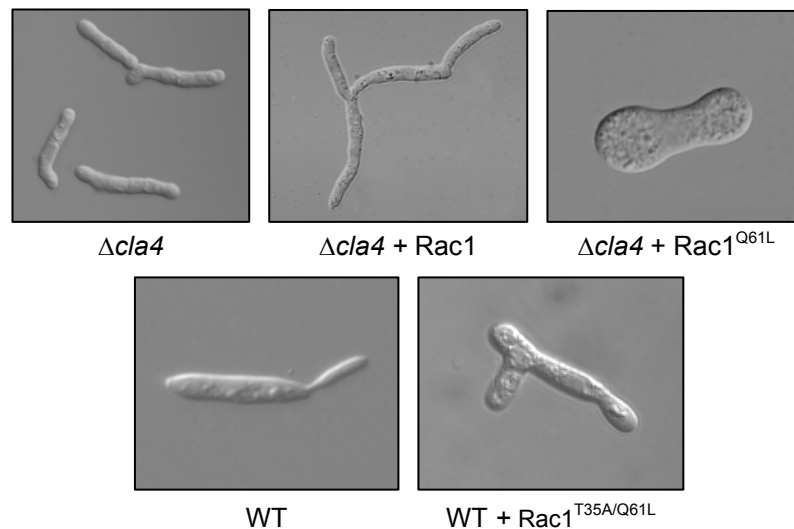


Abbildung 2-13: Cla4 als Effektor von Rac1.

Von Rac1 vermittelte Effekte werden in *cla4*-Deletionsmutanten supprimiert. Die Überexpression von Rac1 führt in diesem Hintergrund nicht zur Filamentbildung und nach Expression von *rac1*^{Q61L} wird keine Vakuolisierung der Zellen beobachtet. Die Überexpression von *rac1*^{Q61L/T35A} führt zu Störungen in der Zellmorphologie, ist aber nicht letal.

2.4.2 Die von Rac1^{Q61L} hervorgerufenen Effekte werden in *cla4*-Deletionsmutanten teilweise supprimiert

Um die Verbindung zwischen Rac1 und Cla4 genauer zu analysieren, wurde auch die konstitutiv aktive Version Rac1^{Q61L} in der *cla4*-Deletionsmutante überexprimiert. Das Protein wirkt interessanterweise auch hier letal und die Zellen stellen das Wachstum komplett ein (Abb. 2-14). Allerdings werden einige Effekte von Rac1^{Q61L} deutlich supprimiert: Anders als im Wildtyphintergrund bleibt das sofortige Aufblähen der Zellen aus (Abb. 2-13). Dies zeigt, dass Cla4 auch bei der Vermittlung der morphologischen Effekte von Rac1^{Q61L} eine

entscheidende Rolle spielt. Allerdings werden aber auch weitere Effektoren aktiviert, die die letale Wirkung von $Rac1^{Q61L}$ vermitteln.

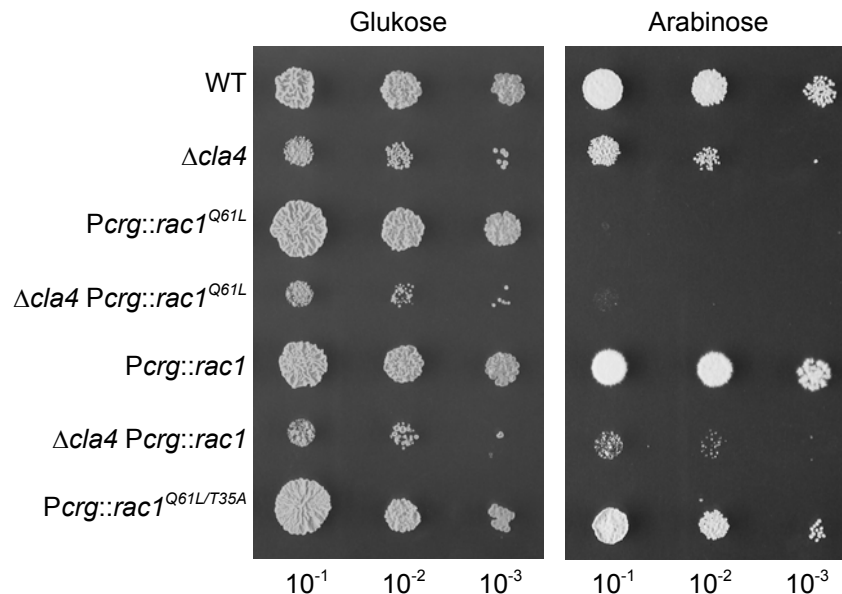


Abbildung 2-14: Lebensfähigkeit von $rac1/cla4$ -Mutanten.

Übernachtskulturen der angegebenen Stämme wurden in 10er-Schritten verdünnt und je 5 μ l wurden auf YNB-G- bzw. YNB-A-Platten getropft. Die auf Arabinose induzierte Expression von $rac1^{Q61L}$ ist sowohl im Wildtyp (WT) als auch in der $cla4$ -Deletionsmutante ($\Delta cla4$) letal. Die induzierte Expression von Rac1 führt im Wildtyp, nicht aber in der $cla4$ -Deletionsmutante zu filamentösem Wachstum, das sich durch die Bildung von weißen, filzig erscheinenden Kolonien äußert. Die Expression des doppelt mutierten Allels $rac1^{Q61L/T35A}$ im Wildtyphintergrund führt nicht zu Letalität.

Um zu ermitteln, ob an Stelle von Cla4 ein anderes CRIB-Domänen-Protein die letale Wirkung von $Rac1^{Q61L}$ vermittelt, wurde in dieses Protein ein weiterer Aminosäureaustausch (T35A) eingeführt. Dieser Aminosäureaustausch führt dazu, dass CRIB-Domänen-Proteine nicht mehr an das G-Protein binden können (Davis et al., 1998; Otilie et al., 1995). Die Expression dieser Mutante von Rac1 in *U. maydis* ist nicht tödlich (Abb.2-14), allerdings ist auch hier die Zellmorphologie gestört (Abb.2-13). Die letale Wirkung von $Rac1^{Q61L}$ wird also vermutlich durch ein CRIB-Domänen-Protein, das nicht identisch mit Cla4 ist, vermittelt.

Gute Kandidaten für dieses CRIB-Domänen-Protein wären die beiden p21 aktivierten Kinasen Smu1 und Skm1. Für beide Proteine wurden im Hefe-Zwei-Hybrid-System Interaktionen mit Rac1 nachgewiesen (B. Sandrock, persönliche Mitteilung). Um zu überprüfen, ob die tödliche Wirkung von $Rac1^{Q61L}$ über Ste20 oder Skm1 vermittelt wird, wurde das Allel in *smu1*- und *skm1*-Deletionsstämme eingebracht und vom *crg*-Promotor überexprimiert. Die Expression des Proteins führte in beiden Stämmen zum unmittelbaren Aufblähen der Zellen (Abb. 2-15). Im $\Delta ste20$ -Hintergrund ist der morphologische Phänotyp

von dem im Wildtyp Hintergrund beobachteten nicht zu unterscheiden. Im $\Delta skm1$ -Hintergrund hingegen blähen sich die Zellen häufig nicht wie im Wildtyp Hintergrund an der Zellspitze auf. Stattdessen sind dann Zellen mit einer Aufblähung in der Zellmitte zu beobachten, die normal ausgebildete Zellspitzen haben. Auch hier ist die Expression von $rac1^{Q61L}$ letal.

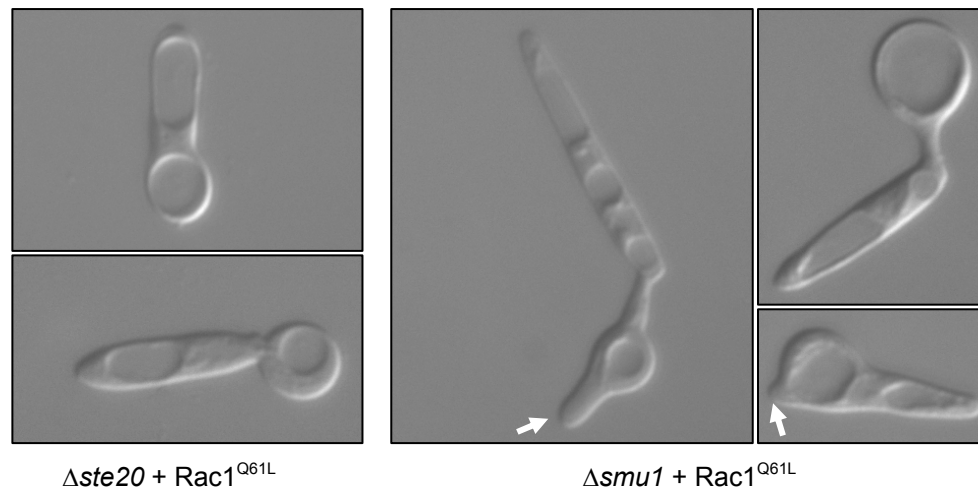


Abbildung 2-15: Expression von $rac1^{Q61L}$ in $ste20$ - und $skm1$ -Deletionsmutanten.

$rac1^{Q61L}$ wurde vom *crg*-Promotor durch Induktion in YNB-A-Medium exprimiert und die Zellen wurden nach fünf Stunden mikroskopisch analysiert. In beiden Stammhintergründen blähen sich die Zellen vergleichbar zur Situation im Wildtyp Hintergrund auf. In $skm1$ -Deletionsmutanten bildet sich die Ausdehnung allerdings häufig in der Zellmitte, die Zellspitzen bleiben zunächst intakt (Pfeil).

2.5 Redundante Funktionen von Cdc42 und Rac1 in der Regulation des Vesikelverkehrs

2.5.1 Konstruktion einer *cdc42/rac1*-Doppelmutante

Die Deletion von *cdc42* in *U. maydis* führt zwar zur Störung der Zelltrennung, hat aber keine Auswirkung auf die Lebensfähigkeit. Dies steht in einem deutlichen Kontrast zu *S. cerevisiae* und *S. pombe*, wo *cdc42* essentiell ist. Diese Organismen besitzen allerdings kein Rac-Homolog, das beim Ausfall von Cdc42 dessen Funktionen zumindest teilweise übernehmen könnte. Für mögliche redundante Funktionen der beiden Proteine in *U. maydis* spricht auch deren ähnliche zelluläre Lokalisation (Abb. 2-16): GFP-Fusionen beider Proteine sind an inneren und an äußeren Membranstrukturen zu finden, außerdem markieren beide Proteine deutlich das primäre und das sekundäre Septum.

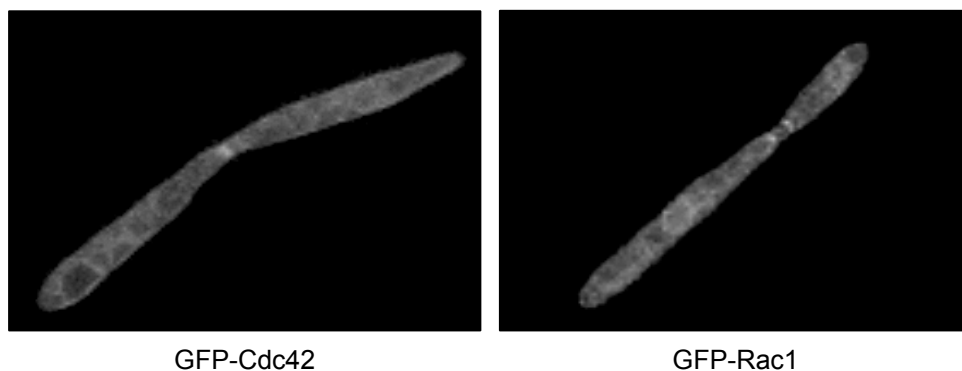


Abbildung 2-16: Lokalisation von Cdc42 und Rac1.

GFP-Rac1 und GFP-Cdc42 wurden unter Kontrolle des konstitutiv aktiven Etef-Promotors exprimiert. In beiden Fällen lokalisieren die Fusionsproteine am primären und sekundären Septum. Zusätzlich sind beide Proteine an inneren und äußeren Membranstrukturen zu finden.

Um zu überprüfen, ob Cdc42 und Rac1 teilweise redundante Funktionen ausüben, wurde ein Stamm konstruiert, in dem *cdc42* deletiert ist und *rac1* konditional vom *crg*-Promotor exprimiert wird. Bei Wachstum dieses Stammes unter reprimierenden Bedingungen sollten beide G-Proteine abwesend sein.

Um dieses Vorhaben realisieren zu können, wurde zunächst ein konditionaler *rac1*-Stamm konstruiert, in dem der *rac1*-Promotor durch den *crg*-Promotor ersetzt ist. Hierfür wurde das Konstrukt pRac1condNAT hergestellt, in dem der *crg*-Promotor und die NAT-Resistenzkassette von einer aufwärts von *rac1* gelegenen Flanke und einer Flanke, die mit dem Startcodon von *rac1* beginnt, umgeben sind. Dieses Konstrukt sollte, wie in Abbildung 2-17 dargestellt, über homologe Rekombination in den *rac1*-Locus integriert werden.

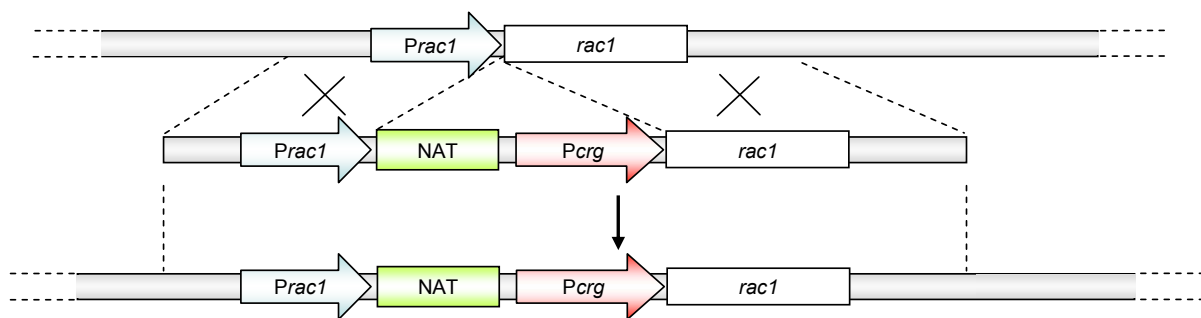


Abbildung 2-17: Konstruktion einer konditionalen *rac1*-Mutante.

Die NAT-Resistenzkassette und der *crg*-Promotor wurden durch homologe Rekombination in den *rac1*-Locus inseriert. Dadurch steht *rac1* nun unter der Kontrolle des *crg*-Promotors.

Die nach Transformation erhaltenen Kandidaten wurden durch Southern Blot überprüft (nicht gezeigt). Positive Kandidaten wurden anschließend auf glukosehaltigem Medium angezogen, um den *crg*-Promotor zu reprimieren. Der Phänotyp glich dem der *rac1*-Deletionsmutante (Abb. 2-18). Durch Überführen der Zellen in arabinosehaltiges Medium wurde die *rac1*-Expression induziert. Dies resultierte in einer Filamentbildung der Zellen, die schon von den *Pcrg::rac1*-Stämmen bekannt war (Abb. 2-18). Die konditionale *rac1*-Mutante ist also ein geeignetes Modellsystem, um die Auswirkungen einer Deletion von *rac1* zu untersuchen.

In dem konditionalen *rac1*-Stamm wurde anschließend *cdc42* deletiert. Dies geschah durch Einbringen des Konstrukts pCdc42ΔHyg in Anwesenheit von Arabinose. Dadurch war sichergestellt, dass *rac1* während der Regeneration exprimiert wurde. Die erhaltenen Transformanten wurden anschließend durch Southern Blot auf die Deletion von *cdc42* überprüft (nicht gezeigt).

2.5.2 Die Abwesenheit von Cdc42 und Rac1 ist letal

Unter induzierenden Bedingungen wachsen die Doppelmutanten ähnlich wie die konditionalen *rac1*-Stämme filamentös (Abb.2-18). Das zeigt, dass Cdc42 für die Rac1-abhängige Filamentbildung nicht essentiell ist. Zusätzlich zeigen die Zellen hier den von der Deletion von *cdc42* herrührenden Zelltrennungsdefekt. Nach Repression der Expression von *rac1* beobachtet man hingegen einen drastischen Phänotyp. Nach einem Tag zeigen die Zellen bäumchenartiges Wachstum in der Art von *cdc42*-Deletionsmutanten. Nach zwei Tagen unter reprimierenden Bedingungen ist das Wachstum der Zellen vollkommen gestoppt und sie arretieren als Cluster großer, rundlich deformierter Zellen (Abb. 2-19).

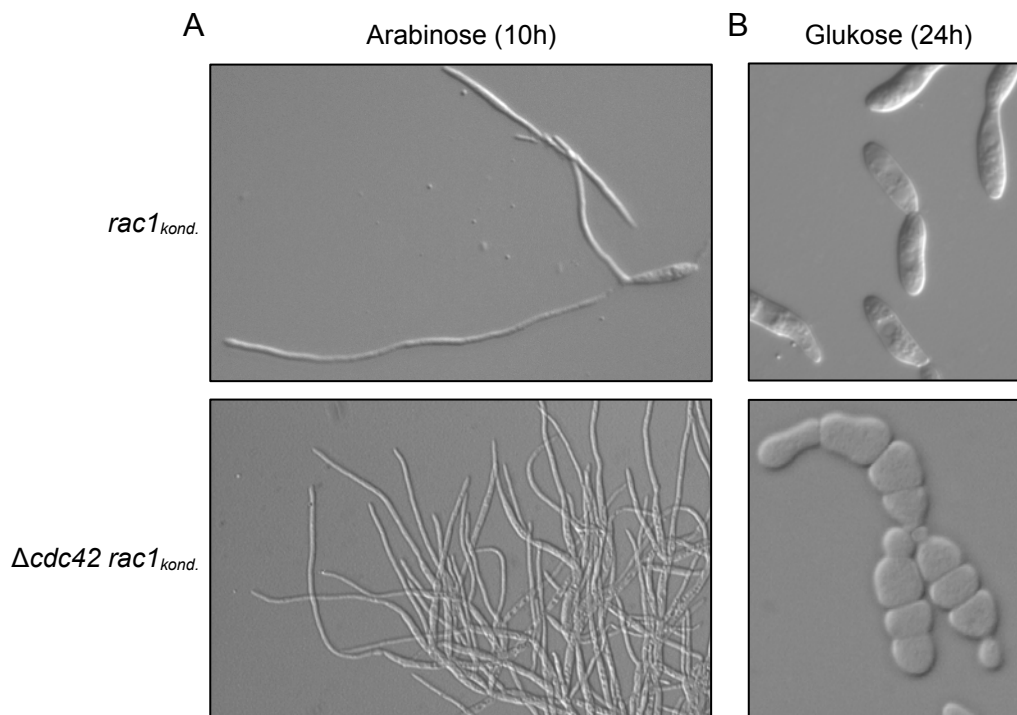


Abbildung 2-18: Regulierte Expression von *rac1* im Wildtyp Hintergrund und in *Δcdc42*-Mutanten.

Die angegebenen Stämme wurden auf YNB-A-Medium angezogen und anschließend auf YNB-G-Medium überführt. A: Nach 24 Stunden Wachstum wurden sie abermals in arabinosehaltiges Medium überführt und nach Ablauf von 10 Stunden mikroskopisch analysiert. Dadurch konnte der *Δcdc42*-abhängige Zelltrennungsdefekt und die *rac1*-abhängige Filamentbildung in einer Aufnahme dokumentiert werden. B: Phänotyp nach 24 Stunden Wachstum auf YNB-G-Medium.

Die Färbung der Zellwand der unter reprimierenden Bedingungen gehaltenen Doppelmutante mit Calcofluor white offenbarte eine starke delokalisierte Ablagerung von Zellwandmaterial. Die Zellpolarität in den Doppelmutanten ist extrem gestört. Die Kernverteilung allerdings weist keine Störung auf: Jede Zelle eines Clusters enthält einen einzelnen Kern (Abb. 2-19).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Anwesenheit von zumindest einer der beiden kleinen G-Proteine Cdc42 oder Rac1 essentiell für das Überleben von *U. maydis* ist.

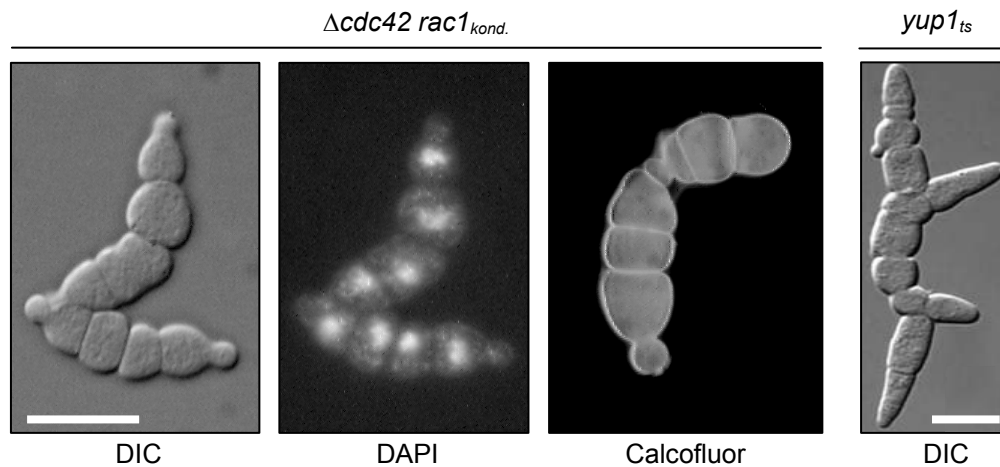


Abbildung 2-19: Die gleichzeitige Abwesenheit von Cdc42 und Rac1 ist letal.

$\Delta cdc42$ -Mutanten, in denen die Expression von *rac1* reprimiert ist, arretieren als Ketten unseparierter Zellen. Färbung der Zellkerne mit DAPI zeigt, dass alle Zellen einen einzelnen Kern enthalten. Die intensive Färbbarkeit der Zellwand mit Calcofluor white spricht für stark delokalisiertes Zellwandwachstum. Der Phänotyp erinnert stark an den von temperatursensitiven *yup1_{ts}*-Mutanten unter nichtpermissiven Bedingungen. Der Maßstab entspricht einer Länge von 10 μ M (Abbildung der *yup1_{ts}*-Mutante entnommen aus Wedlich-Söldner et al., 2000).

2.5.3 Cdc42 und Rac1 haben redundante Funktionen in der Regulation des Vesikelverkehrs

Die Zellmorphologie der *cdc42/rac1*-Doppelmutante erinnert sehr stark an die von konditionalen *yup1_{ts}*-Mutanten unter nicht permissiven Bedingungen (Wedlich-Söldner et al., 2000). Bei Yup1 handelt es sich um einen endosomalen tSNARE, der das Andocken von endocytotischen Vesikeln an frühe Endosomen vermittelt. Unter nicht permissiven Bedingungen zeigen *yup1_{ts}*-Mutanten einen Endocytosedefekt und arretieren als Cluster unseparierter Zellen. Dies ließ die Vermutung aufkommen, dass auch bei der Doppelmutante Defekte im Vesikelverkehr für den terminalen Phänotyp verantwortlich sein könnten. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Endocytose in den Einzelmутanten und der Doppelmutante mit Hilfe des Styrylfarbstoffs FM4-64 verfolgt. Dieser lipophile Fluoreszenzmarker integriert in die Zellmembran und wird von dort über endocytotische Vesikel zur Vakuolenmembran transportiert (Vida and Emr, 1995). Er eignet sich daher hervorragend, um endocytotische Prozesse zu studieren. In *U. maydis* ist dieser Farbstoff bereits etabliert (Wedlich-Söldner et al., 2000). In pulse-chase Experimenten färbt er hier

zunächst intensiv die Zellmembran. Dann wird er aufgenommen und ist zunächst in stationären dreilappigen Regionen und anschließend in mobilen frühen Endosomen sichtbar. Schließlich wird er in die Vakuolenmembran integriert und färbt ausschließlich diese an. Diese Art von pulse-chase Experiment wurde nun mit den Einzelmutanten und der Doppelmutante durchgeführt (siehe Material und Methoden). Die Zellen wurden mit FM4-64 gefärbt und nach einer Minute mit Wasser gewaschen, um den nicht in die Zellmembran integrierten Farbstoff zu entfernen. Dann wurden die Zellen nach fünf und nach 60 Minuten fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Dabei zeigte sich, dass Cdc42 für die Endocytose und die Fusion der endocytotischen Vesikel mit der Vakuole nicht notwendig ist. Die *cdc42* Deletionsmutanten verhalten sich in dem Experiment genau so wie der Wildtypstamm (Abb. 2-20). In beiden Fällen sind fünf Minuten nach dem Puls die frühen endocytotischen Vesikel zu erkennen, während ein Teil des Farbstoffs noch in der äußeren Zellmembran integriert ist. Nach 60 Minuten hingegen ist in beiden Fällen der Farbstoff nahezu komplett in die Vakuolenmembran transportiert worden, die nun deutlich gefärbt ist.

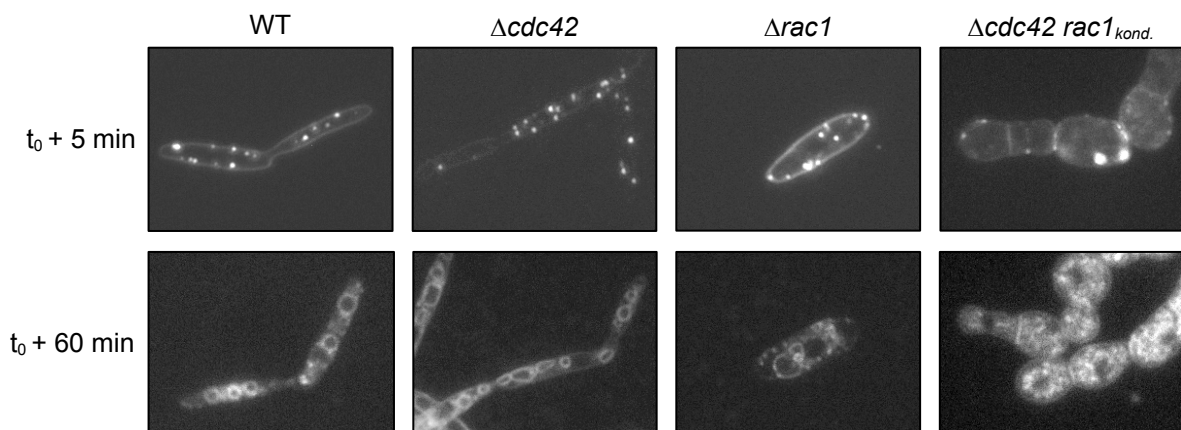


Abbildung 2-20: Einfluss von Cdc42 und Rac1 auf die Endocytose.

Die Zellen wurden einem Pulse-Chase-Experiment mit FM4-64 unterworfen. Fünf Minuten und 60 Minuten nach dem Puls (t_0) wurden mikroskopische Aufnahmen der mit dem Farbstoff markierten Zellen gemacht. In Wildtypzellen ist nach 60 Minuten der Farbstoff nahezu komplett in die Vakuolenmembran integriert worden. Dieselbe Verteilung zeigt der Farbstoff in der $\Delta cdc42$ -Mutante. In der $\Delta rac1$ -Mutante allerdings verläuft der Prozess verlangsamt. Nach fünf Minuten erkennt man hier deutlich die frühen Endosomen, aber der Transport zur Vakuolenmembran ist nach 60 Minuten nicht komplett abgeschlossen und ein Großteil des Farbstoffs verbleibt in kleinen Vesikeln, die keinen Anschluss an die Vakuole finden. In der *cdc42/rac1*-Doppelmutante fehlen die typischen Endocytosestrukturen weitgehend. Stattdessen bilden sich vereinzelt stark gefärbte Cluster aus. Nach 60 Minuten ist das Cytoplasma mit kleinen Vesikeln angefüllt, die Integration in die Vakuole findet nicht statt.

Auch in *Δrac1*-Mutanten ist nach 60 Minuten die Vakuolenmembran gut zu erkennen. In diesen Zellen wird jedoch in dieser Zeitspanne nicht der komplette Farbstoff dorthin transportiert, sondern er verbleibt teilweise in kleinen cytoplasmatischen Vesikeln. Der Transport zur Vakuole fällt in diesem Fall nicht komplett aus, verläuft aber deutlich ineffizienter. Rac1 ist also an diesem Prozess beteiligt.

In der *rac1/cdc42*-Doppelmutante zeigt FM4-64 schon nach fünf Minuten ein anormales Verteilungsmuster. Die frühen Endosomen in ihrer normalen Gestalt sind nicht zu erkennen, stattdessen bilden sich vereinzelt sehr stark gefärbte große Cluster an der Zellmembran aus. Nach 60 Minuten hat sich der Farbstoff komplett im Zellinneren verteilt. Allerdings ist keine Färbung einer zentralen Vakuole zu erkennen, sondern es bilden sich unregelmäßige kleine vesikuläre Strukturen aus, die das gesamte Zytoplasma ausfüllen. Der Prozess der Endocytose ist also abhängig von der Präsenz mindestens einer der beiden kleinen G-Proteine Cdc42 oder Rac1. Da aber in der *cdc42*-Mutante allein kein Defekt auszumachen ist, läuft die Regulation dieses Prozesses wahrscheinlich hauptsächlich über Rac1. In Abwesenheit von Rac1 kann Cdc42 dessen Funktionen teilweise übernehmen und die Endocytose verläuft, wenn auch verlangsamt, weiterhin ab. Die beiden Proteine üben also eine redundante Funktion bei der Regulation des endocytotischen Vesikelverkehrs aus.

2.5.4 Die Vesikelfusion ist in der *cdc42/rac1*-Doppelmutante blockiert

In Abwesenheit von Cdc42 und Rac1 ist, wie in Abbildung 2-20 gezeigt, das gesamte Cytoplasma von irregulären Vesikeln angefüllt, die nicht mit der Vakuole fusioniert sind. Für eine Vakuole scheint hier sogar überhaupt kein Platz mehr vorhanden zu sein. Deshalb sollte im Folgenden überprüft werden, ob in der Doppelmutante überhaupt noch zentrale Vakuolen vorhanden sind. Hierzu eignet sich der Fluoreszenzfarbstoff CMAC (CellTracker™ blue). Dieser auf Cumarin basierte Farbstoff fluoresziert im sauren Milieu und macht daher selektiv die Vakuole sichtbar (Stefan and Blumer, 1999; Stewart and Deacon, 1995). Die Einzel- und Doppelmutanten wurden gleichzeitig mit FM4-64 und CMAC gefärbt. Dadurch konnte sowohl der Habitus der zentralen Vakuolen als auch die Fusion der endocytotischen Vesikel an die Vakuolenmembran untersucht werden. Im Wildtyp und in der *cdc42*-Mutante zeigen sich dabei keine Unterschiede. Die Zellen enthalten bis zu fünf große Vakuolen, deren Lumen durch CMAC gefärbt wird (grün in Abbildung 2-21). In die Membran dieser Vakuolen ist FM4-64 effizient integriert worden, sodass die grün gefärbten Vakuolen in Abbildung 2-21

von einem roten Ring umgeben sind. In *rac1*-Mutanten ist die Vakuolenbildung beeinträchtigt, sodass sich neben den größeren Vakuolen auch sehr viele kleinere mit CMAC anfärbbare Vesikel finden.

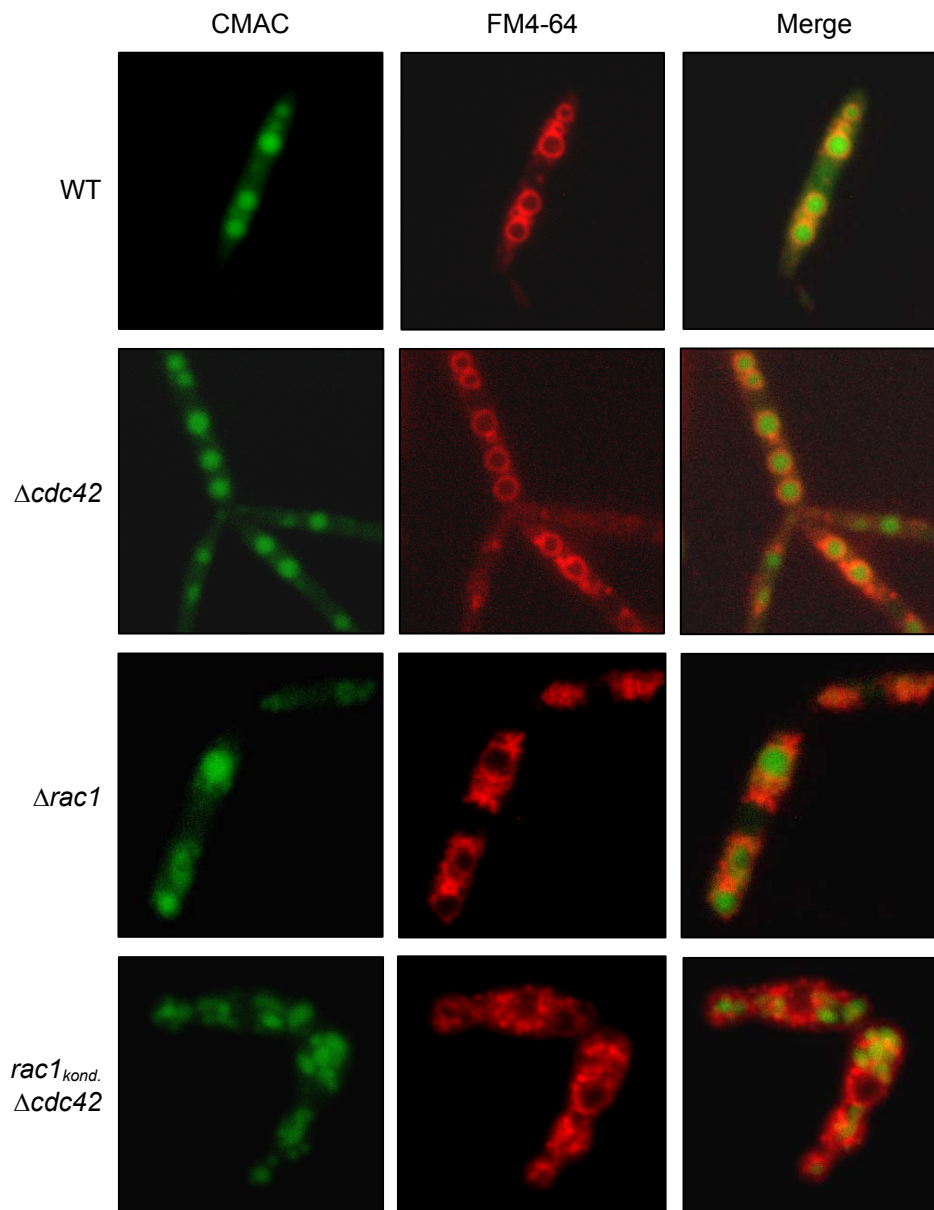


Abbildung 2-21: Einfluss von Cdc42 und Rac1 auf die Vakuolenfusion.

Die Stämme wurden mit CellTracker™ blue (CMAC, linke Spalte) und mit FM4-64 (mittlere Spalte) gefärbt. Während im Wildtyp und der *cdc42*-Mutante keine Auffälligkeiten auftreten, sind in der *rac1*-Mutante die Vakuolen teilweise fragmentiert. Die Fusion der endocytotischen Vesikel mit der Vakuolenmembran ist hier ebenfalls beeinträchtigt. Beide Defekte treten in der Doppelmutante deutlich stärker auf. Hier ist die Vakuole stark fragmentiert. Außerdem ist keine Fusion der endocytotischen Vesikel mit den Vakuolen zu erkennen. Die fragmentierten Vakuolen und die endocytotischen Vesikel liegen nebeneinander im Cytoplasma vor.

Außerdem ist auch hier, wie schon in Abbildung 2-20 gezeigt, die Fusion der endocytotischen Vesikel mit der Vakuolenmembran verlangsamt. In der Doppelmutante schließlich ist die Vakuole extrem stark fragmentiert. Es findet sich eine Vielzahl kleinerer und größerer mit CMAC gefärbter Vesikel. Diese zeigen keine Kolo-kalisation mit den von FM4-64 markierten Vesikeln. Diese können also nicht mit den fragmentierten Vakuolen fusionieren. Sowohl für die Vakuolenbildung als auch die Fusion endocytotischer Vesikel mit der Vakuole wird also die Anwesenheit zumindest eines der beiden G-Proteine benötigt.

2.5.5 Cla4 ist an der Vakuolenbildung beteiligt

Um näher einzugrenzen, über welche Signalwege Cdc42 und Rac1 den Vesikelverkehr regulieren, wurden Deletionsmutanten der bereits bekannten Effektoren der beiden G-Proteine der Färbung mit CMAC und FM4-64 unterworfen. Es handelt sich hierbei um die drei Kinasen der PAK Familie: Smu1, Skm1 und Cla4, die alle eine CRIB-Domäne enthalten. Die Anwesenheit dieser Domäne legt die Vermutung nahe, dass sie von einem der beiden G-Proteine aktiviert werden. Außerdem wurden bereits Interaktionen dieser Kinasen mit den beiden G-Proteinen im Hefe-Zwei-Hybrid-System nachgewiesen: So interagieren Cla4 und Smu1 jeweils mit Rac1 und Cdc42 (Leveleki et al., 2004), Skm1 hingegen nur mit Rac1 (B. Sandrock, persönliche Mitteilung). In keiner der Mutanten wurden gravierende Defekte im Vesikeltransport festgestellt. In der *cla4*-Mutante und der *smu1*-Mutante läuft die Endocytose allerdings ähnlich wie in der *rac1*-Mutante verlangsamt ab, sodass nach einer Stunde nicht das gesamte FM4-64 zur Vakuole transportiert worden ist (Abb. 2-22). Bei gleichzeitiger Abwesenheit von Cla4 und Rac1 ergibt sich hingegen ein komplett neuer Phänotyp: hier ist zwar die Vakuole stark fragmentiert, aber die endocytotischen Vesikel sind in der Lage, mit den kleinen Vakuolen zu fusionieren. Die fragmentierten Vakuolen sind hier also, anders als bei der gleichzeitigen Abwesenheit von Cdc42 und Rac1, mit FM4-64 anfärbbar. Dies spricht dafür, dass Cla4 die Regulation der Fusion von vakuolären Vesikeln steuert. Hierfür kann es vermutlich von Rac1 und Cdc42 aktiviert werden, was daraus ersichtlich ist, dass die Vakuolenfusion in Abwesenheit einer der beiden G-Proteine, nicht jedoch bei Abwesenheit von beiden Proteinen funktioniert.

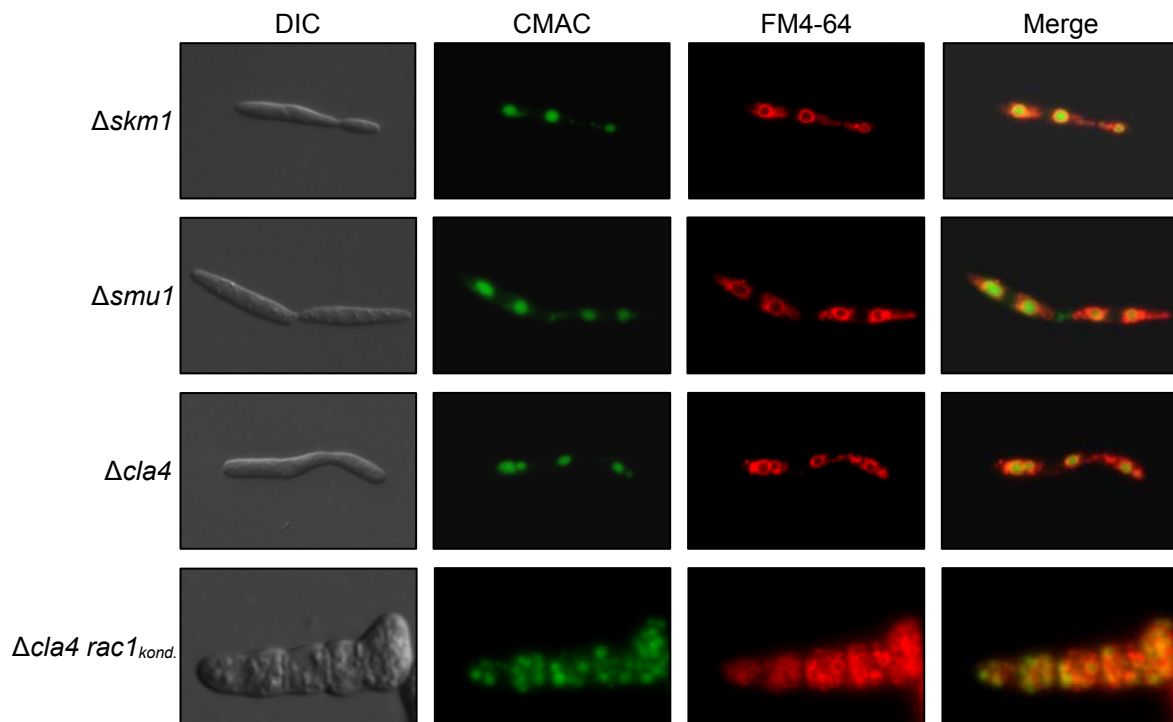


Abbildung 2-22: Funktionen von Kinasen der PAK-Familie bei der Vesikelfusion.

Die Stämme wurden auf YNB-G-Medium angezogen und mit CellTracker™ blue (CMAC) und FM4-64 gefärbt. In *smu1*- und *cla4*-Deletionsstämmen läuft die Endocytose ineffizienter ab. In Abwesenheit von Cla4 und Rac1 ($\Delta cla4$, *rac1_{kond.}*) sind die Vakuolen stark fragmentiert. Allerdings läuft auch in diesem Fall die Endocytose noch ab und FM4-64 erreicht die fragmentierten Vakuolen.

2.6 Ras1 ist ein essentielles Protein

2.6.1 Konstruktion einer konditionalen *ras1*-Mutante

In mehreren pilzlichen Organismen wurden in den letzten Jahren Hinweise auf ein Zusammenspiel der kleinen G-Proteine der Ras- und der Rho/Rac-Familie erhalten (Boyce et al., 2005a; Chen and Dickman, 2004; Vallim et al., 2005). Dabei zeigte sich, dass die Ras-Proteine häufig in Signalwegen oberhalb von Cdc42 oder Rac1 einzuordnen sind und es enge Beziehungen zwischen den Effekten der Ras-Proteine und der Proteine der Rho/Rac-Familie in einem Organismus gibt. Aus diesem Grunde befasst sich der zweite Teil dieser Arbeit mit der Charakterisierung der Ras-Proteine in *U. maydis*. Der Organismus verfügt über zwei Ras-Proteine, Ras1 und Ras2. Für *ras2* wurden die Auswirkungen der Deletion (Lee and Kronstad, 2002) und der Expression eines konstitutiv aktiven Allels (Lee and Kronstad, 2002; Müller et al., 2003a) bereits beschrieben. *ras1* hingegen wurde bisher weniger intensiv untersucht. Lediglich die Expression eines konstitutiv aktiven Allels wurde beschrieben. Diese hat keine Auswirkungen auf die Zellmorphologie, induziert aber die Expression des Pheromogens *mfal* (Müller et al., 2003a). Um das Bild der Ras-Proteine in *U. maydis* weiter zu vervollständigen, sollte Ras1 genauer untersucht werden. Um die Funktionen dieses Proteins in *Ustilago maydis* näher zu charakterisieren, wurde eine konditionale Mutante hergestellt. Dies erfolgte nach dem gleichen Prinzip, das für die Konstruktion der konditionalen *rac1*-Mutante angewendet wurde (vgl. Abb. 2-17). Allerdings wurde zur Selektion eine Hygromycin-Resistenzkassette verwendet. Die nach Transformation mit dem Konstrukt pRas1condHyg entstandenen Klone wurden durch Southern Blot überprüft. Hierfür wurde die DNA mit EcoRI geschnitten. Dadurch ergibt sich im Wildtyp ein 3235 bp großes Fragment, das den *ras1*-ORF enthält. Bei korrekter Integration des Konstrukts vergrößert sich dieses Fragment um die Länge der integrierten Kassette auf 7154 bp. So konnten Klon 2 und 13 als korrekte Mutanten identifiziert werden (Abb. 2-23).

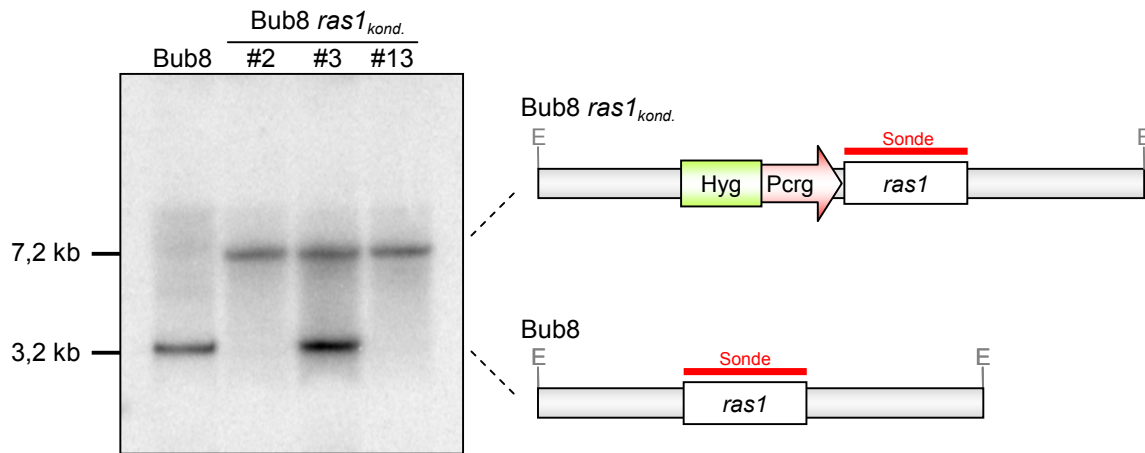


Abbildung 2-23: Southern-Analyse der konditionalen *ras1*-Mutanten.

Die DNA wurde mit EcoRI geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und einem Southern Blot unterzogen. Als Sonde wurde der *ras1*-ORF verwendet (rot). Dadurch ergibt sich im Wildtyp eine Fragmentgröße von 3235 bp. Bei korrekter Integration des Konstrukts liegt hingegen ein Fragment von 7154 bp Größe vor (siehe Schema). Bei ektopischer Integration taucht neben der Wildtypbande eine zweite Bande auf, wie hier bei Kandidat 3. Kandidat 2 und 13 sind positiv. E: Restriktionsschnittstelle EcoRI

2.6.2 Die Abwesenheit von Ras1 führt zu morphologischen Defekten und zu fehlerhafter Kernverteilung

Die konditionalen *ras1*-Mutanten wurden in YNB-A-Medium angezogen, um eine Expression von *ras1* vom *crg*-Promotor zu ermöglichen und einer mikroskopischen Analyse unterzogen (Abb. 2-24). Außerdem wurde ein Teil der Übernachtskultur in glukosehaltiges Medium überführt, um die Expression von *ras1* auszuschalten. Diese Zellen wurden dann nach 24 und 48 Stunden mikroskopisch analysiert, um die Effekte der Abwesenheit von Ras1 zu untersuchen.

Bereits unter induzierenden Bedingungen zeigen die Zellen eine auffällige Morphologie. Es werden filamentöse Hyphen gebildet (Abb. 2-24). Die Färbung mit Calcofluor white zeigt, dass an der Spitze der Hyphe massiv neues Zellwandmaterial eingebaut wird. Außerdem sind die Hyphen ähnlich wie in den *rac1* überexprimierenden Stämmen septiert.

Nach 24 Stunden unter reprimierenden Bedingungen erinnern die Zellen in ihrer Morphologie an *rac1*-Deletionsmutanten. Auch hier sind die Zellen runder und dicker. Außerdem wird auch hier zwischen den einzelnen Zellen nur ein Septum ausgebildet, an dem die Zellen sich voneinander abschnüren. Diese Abschnürung verläuft aber anscheinend langsamer als in *rac1*-Deletionsmutanten: Hier hängen häufiger mehrere Zellen zusammen und bilden einen Cluster.

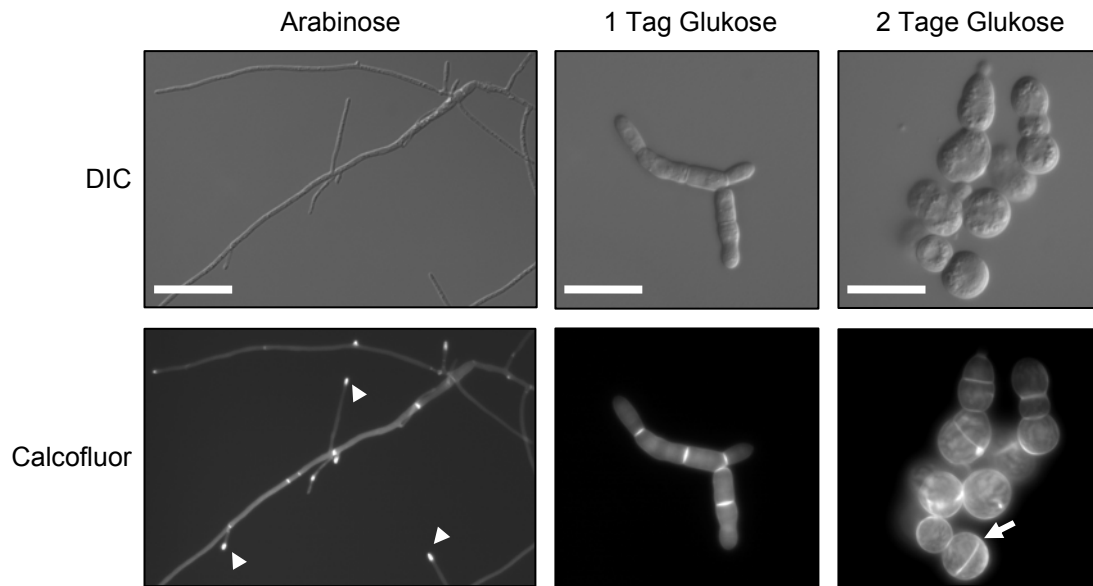


Abbildung 2-24: Morphologie der konditionalen *rasI*-Mutante.

Die Zellen wurden auf induzierendem YNB-A-Medium angezogen und anschließend in reprimierendes YNB-G-Medium überführt. Zu mehreren Zeitpunkten wurden Zellen mit Calcofluor white gefärbt und mikroskopisch analysiert. Unter induzierenden Bedingungen zeigen die Zellen eine deutliche Filamentbildung. Calcofluor white färbt hier stark die wachsende Zellspitze (Pfeilkopf) und in das Filament eingezogene Septen. Nach einem Tag unter reprimierenden Bedingungen sind die Zellen dicker und runder. Außerdem bilden sich Einzelsepten. Nach zwei Tagen sind die Zellen komplett abgerundet und liegen in Clustern vor. Häufig enthalten diese eine äquatorial verlaufende mit Calcofluor white anfärbbare Leiste (Pfeil). Der Maßstab entspricht einer Länge von 10 µm.

Nach zwei Tagen unter reprimierenden Bedingungen zeigen sich allerdings deutlich stärkere morphologische Defekte als in den *racI*-Deletionsmutanten. Die Zellen haben nun eine apolare, kugelförmige Gestalt und sind deutlich voluminöser. Die einzelnen Zellen sind durch Einzelsepten getrennt. Ähnlich wie bei gleichzeitiger Abwesenheit von Cdc42 und Rac1 bilden sich Cluster aus, in denen mehrere Zellen zusammenhängen. Calcofluor white färbt hier zusätzlich zu den Septen häufig leistenartige Verstärkungen der Zellwand, die meist über den Äquator der kugelförmigen Zellen verlaufen (Pfeil in Abb. 2-24). Das Zellwachstum wird in dieser Phase eingestellt, was durch Wachstumsversuche auf glukosehaltigen Platten gezeigt werden konnte (siehe Abb. 2-33).

Unter reprimierenden Bedingungen wurde eine Kernfärbung durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die Kernverteilung in Abwesenheit von Ras1 gestört ist: Häufig finden sich in einer Zelle mehrere Kerne. Andere Zellen hingegen enthalten überhaupt keinen Kern (Abb. 2-25). Die Koordinierung von Kern- und Zellteilung ist also von Ras1 abhängig.

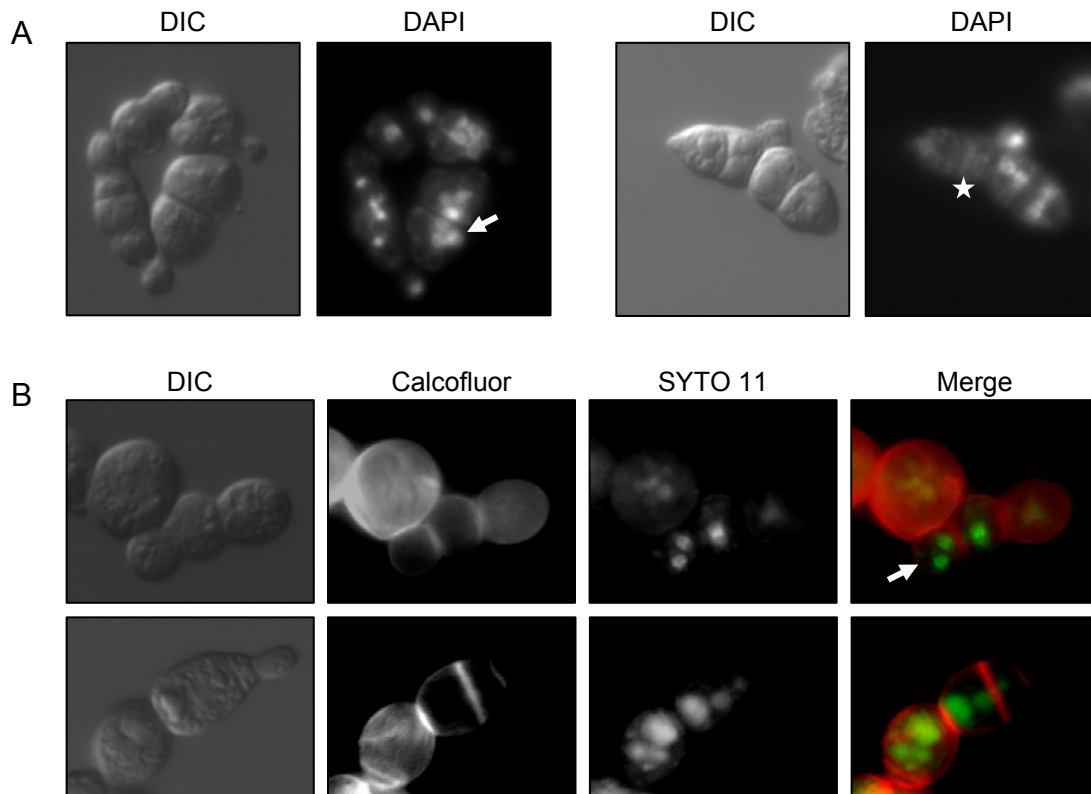


Abbildung 2-25: Die Kernverteilung ist in Abwesenheit von Ras1 gestört.

A: DAPI-Färbung. Die konditionale *ras1*-Mutante wurde in arabinosehaltigem Medium angezogen und dann auf Glukosehaltiges Medium überführt. Nach 48 Stunden unter diesen Bedingungen wurden die Zellen mit DAPI gefärbt. Der Pfeil markiert eine Zelle, die drei Kerne enthält, der Stern markiert eine Zelle ohne Kern.

B: SYTO11 und Calcofluor white-Färbung. Die Zellen wurden angezogen wie in A. Anschließend wurde eine Färbung mit Calcofluor white (rot) und SYTO11 (grün) durchgeführt. Die Färbung zeigt, dass die Kerne in mehrkernigen Zellen nicht durch Septen voneinander getrennt sind (Pfeil).

2.7 Ras1 ist ein zentraler Regulator der Vakuolenfusion

2.7.1 Die Abwesenheit von Ras1 führt zur Blockade der Vesikelfusion

Der morphologische Defekt, der sich in Abwesenheit von Ras1 ausbildet, ähnelt ebenfalls dem von *yup1^{ts}*-Mutanten und dem von *cdc42/rac1*-Doppelmutanten (vgl. Abb. 2-19). Daher wurde auch in den *ras1*-Mutanten die Endocytose und die Vakuolenfusion untersucht. Dabei fiel auf, dass sich häufig in einem Zellcluster nicht alle Zellen mit dem Vakuolenmarker CMAC färben lassen (Abb. 2-26a). Einige Zellen bleiben bei der Behandlung völlig ungefärbt. Dies lässt sich allerdings mit der Kernverteilung in den Zellen korrelieren: Alle Zellen, die einen oder mehrere Kerne haben, lassen sich mit CMAC färben, kernlose Zellen hingegen bleiben ungefärbt. Vermutlich sind die kernlosen Zellen zu diesem Zeitpunkt bereits tot und besitzen keine Vakuole mehr, in der der pH-Wert erniedrigt ist.

Im Folgenden wurden deshalb nur Zellen untersucht, die sich mit CMAC färben ließen. Auch in diesen Zellen ist der Vesikelverkehr allerdings empfindlich gestört (Abb. 2-26b). Der Endocytosemarker FM4-64 wird ähnlich wie bei gleichzeitiger Abwesenheit von Cdc42 und Rac1 in ungeordneten diffusen Vesikeln in der Zelle angereichert. Außerdem ist auch hier die Vakuole stark fragmentiert.

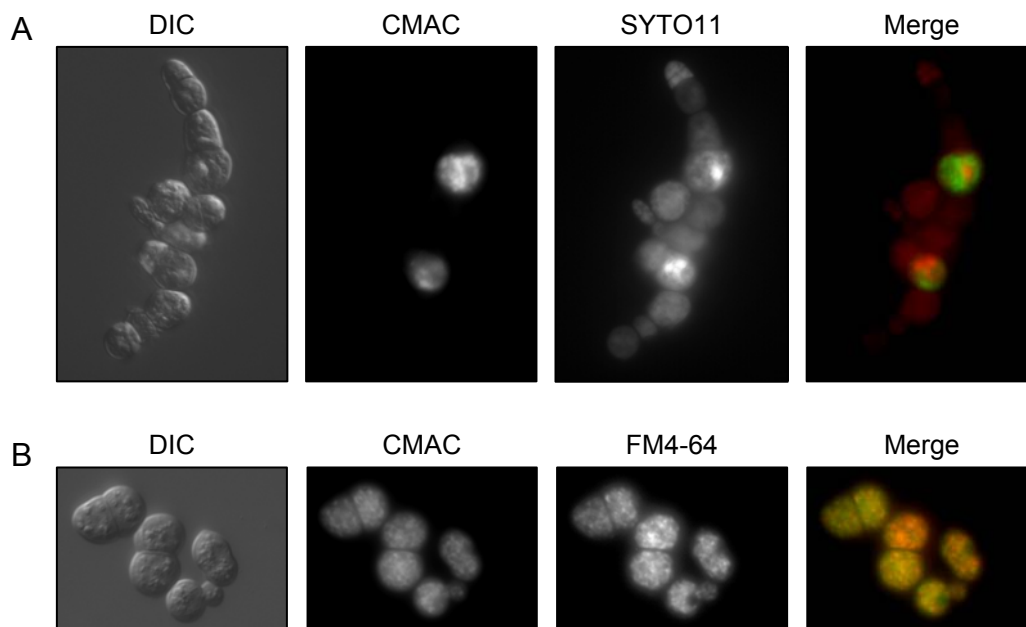


Abbildung 2-26: Die Vesikelfusion ist in Abwesenheit von Ras1 gestört.

A: Zellen ohne Kern sind CMAC-negativ. Konditionale *ras1*-Mutanten wurden unter reprimierenden Bedingungen mit CMAC und SYTO11 gefärbt. Nur die Zellen, die einen Kern enthalten, zeigen eine Reaktion auf den Farbstoff CMAC.

B: Endocytose und Vakuolenmorphologie sind in konditionalen *ras1*-Mutanten gestört. Die Zellen wurden mit CMAC und FM4-64 gefärbt. Die Vakuole ist fragmentiert und die Fusion der endocytotischen Vesikel mit der Vakuole ist gestört.

2.7.2 Ras1 reguliert die Vakuolenfusion über die Aktivierung von Rac1

Der in Abwesenheit von Ras1 beobachtete Defekt im Vesikelverkehr ähnelt dem bei gleichzeitiger Abwesenheit von Cdc42 und Rac1 beobachteten Defekt (vgl. Abb. 2-21). In beiden Fällen ist die Vakuole stark fragmentiert und die endocytotischen Vesikel finden keinen Anschluss an die Vakuole, sondern verbleiben im Cytoplasma. Dies warf die Frage auf, ob Ras1 möglicherweise in dem gleichen Signalweg wie Rac1 und Cdc42 die Vesikelfusion organisiert. Um dies zu testen, wurde ein Stamm konstruiert, in dem sich die Expression von *ras1* und *rac1*^{Q61L} unabhängig voneinander regulieren lässt. Zu diesem Zweck wurde das Konstrukt pRU2ΔNotI-Rac1^{Q61L} erstellt, in dem *rac1*^{Q61L} unter der Kontrolle des *nar1*-Promotors steht, und in den *cbx*-Locus des konditionalen *ras1*-Stammes eingebracht. Der *nar*-Promotor ist in Anwesenheit von Ammonium als Stickstoffquelle reprimiert, in Anwesenheit von Nitrat als einziger Stickstoffquelle hingegen aktiviert (Brachmann et al., 2001). Auf YNB-A-NH₄-Medium, das Arabinose und Ammoniumsulfat enthält, wächst dieser Stamm wie erwartet hyperpolarisiert, da *ras1* exprimiert wird, während Rac1^{Q61L} abwesend ist. Überführen des Stammes auf Medium, das Kaliumnitrat und Arabinose enthält, führt durch Induktion der Expression von *rac1*^{Q61L} zum unmittelbaren Aufblähen der Zellen. Auf YNB-G-NH₄-Medium, das Glukose und Ammoniumsulfat enthält, sind sowohl Ras1 als auch Rac1^{Q61L} abwesend, was zur Fragmentierung der Vakuolen führt. Der Wechsel der Stickstoffquelle zu Kaliumnitrat führt dann zur Expression von *rac1*^{Q61L}. Unter diesen Bedingungen beobachtet man die Entstehung einer großen Vakuole. Dies bedeutet, dass Rac1^{Q61L} auch in Abwesenheit von Ras1 in der Lage ist, die Vakuolenfusion und die Fusion der endocytotischen Vesikel mit der Vakuole zu steuern (Abb. 2-27). Diese epistatische Analyse zeigt, dass Ras1 die Vakuolenfusion über die Aktivierung von Rac1 steuert.

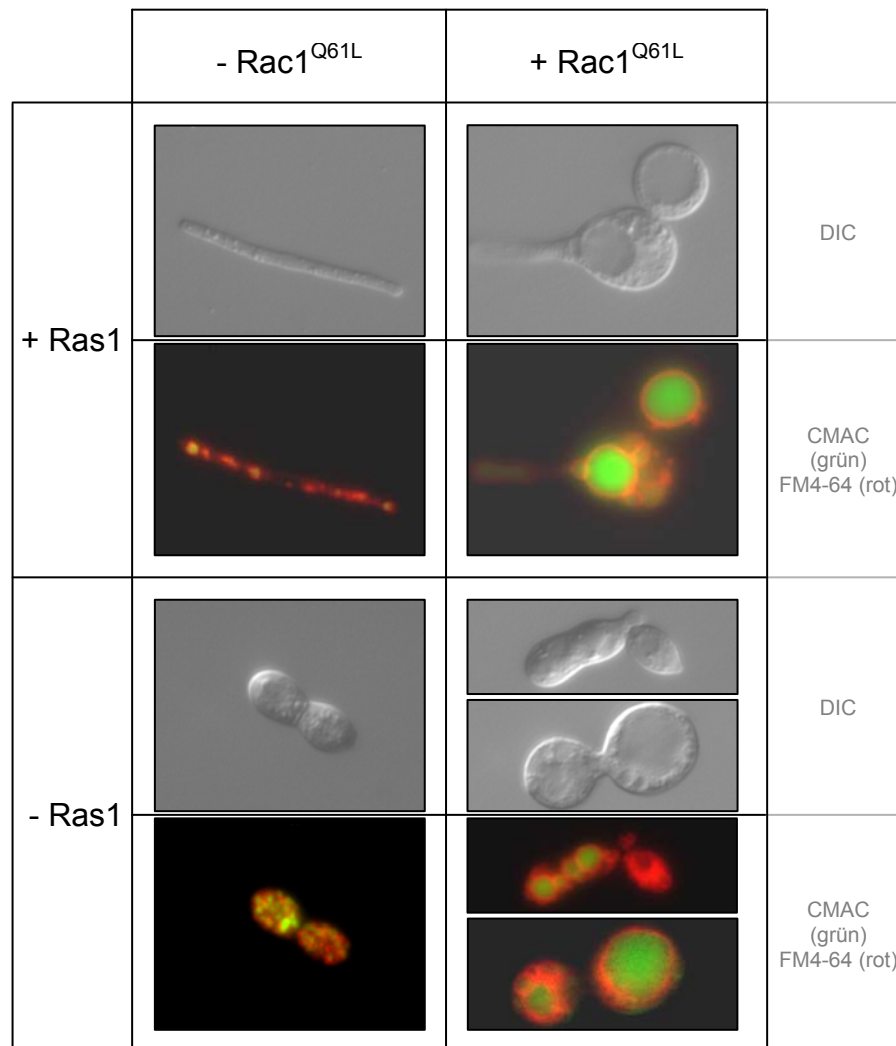


Abbildung 2-27: Ras1 reguliert die Vesikelfusion über die Aktivierung von Rac1.

Der konditionale *ras1*-Stamm, der *rac1*^{Q61L} vom *nar*-Promotor exprimiert, wurde auf YNB-A-NH₄-Medium angezogen und gleichzeitig einer FM4-64-Färbung (rot) und einer CMAC-Färbung (grün) unterworfen (oben links: +Ras1, -Rac1^{Q61L}). Außerdem wurden auf diese Weise angezogene Zellen in YNB-A-KNO₃-Medium überführt, um die Expression von *rac1*^{Q61L} zu induzieren. Nach Ablauf von zwölf Stunden wurden diese Zellen der Färbung unterworfen (oben rechts: +Ras1, +Rac1^{Q61L}). Um die Expression von *ras1* auszuschalten, wurden auf YNB-A-NH₄ angezogene Zellen für 24 Stunden auf YNB-G-NH₄-Medium überführt und anschließend der Färbung unterworfen (unten links: -Ras1, -Rac1^{Q61L}). Schließlich wurden diese Zellen auf YNB-G-KNO₃-Medium überführt, um in Abwesenheit von Ras1 die Expression von *rac1*^{Q61L} zu stimulieren. Nach 12 Stunden wurden auch diese Zellen der Färbung unterworfen (unten rechts: -Ras1, +Rac1^{Q61L}).

2.8 Die Auswirkungen erhöhter Aktivität von Ras1

2.8.1 Überexpression von dominant aktivem *ras1*^{Q67L}

Die morphologischen Auswirkungen der Überexpression von Ras1 waren überraschend, da für Ras1 bereits beschrieben wurde, dass selbst die Überexpression der konstitutiv aktiven Version Ras1^{Q67L} überhaupt keine erkennbaren morphologischen Auswirkungen habe (Müller et al., 2003a). Da dies im Widerspruch zu dem hier beobachteten starken Einfluss von Ras1 auf die Zellmorphologie stand, wurde die bisher veröffentlichte Sequenz von *ras1* überprüft. Hierbei zeigte sich, dass es in dem von Müller et al. isolierten Allel zu einer kurzen Insertion in der Sequenz gekommen war (Abb. 2-28).

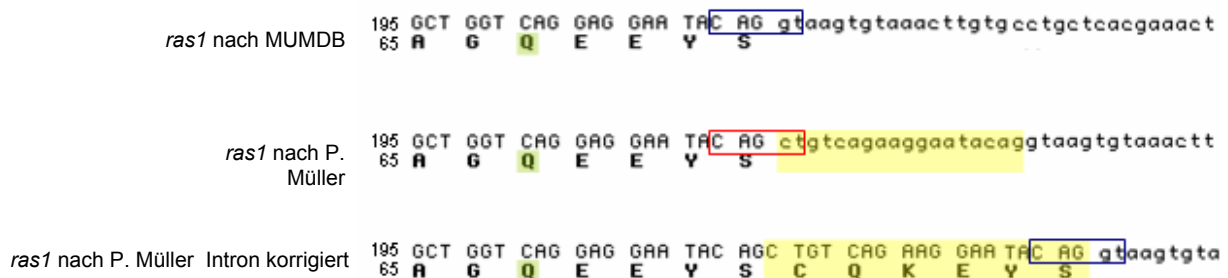


Abbildung 2-28: Sequenzinsertion im von Müller et al. untersuchten *ras1*-Allel.

Vergleich der Sequenz von *ras1* nach der öffentlich zugänglichen Genomdatenbank von *U. maydis* (MUMDB, <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago>) mit der Sequenz, die von Müller et al. veröffentlicht wurde (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=27752294>). Die Exonsequenz ist in Großbuchstaben, die Intronsequenz in Kleinbuchstaben wiedergegeben. Außerdem ist die von den Allelen kodierte Proteinsequenz angegeben. Die Insertion von 18 Nukleotiden in der Sequenz nach Müller et al. ist gelb markiert. Die Exon/Intron-Grenzen (blau) richten sich nach den Angaben in MUMDB. Rot: Fehlerhafter Exon/Intron-Übergang nach Müller et al.. Durch die Korrektur des Exon/Intron-Übergangs ergibt sich eine Insertion von sechs Aminosäuren in der Proteinsequenz. Diese kommt in der von Müller et al. angegebenen Proteinsequenz nicht vor, da dort ein falscher Exon/Intron-Übergang zugrunde gelegt wurde. Grün: Aminosäure Glu⁶⁷.

Die Insertion in der Gensequenz ist in Abbildung 2-28 in gelb hervorgehoben. Die von Müller et al. veröffentlichte Proteinsequenz weist interessanterweise keinen Unterschied zu der in der öffentlichen Genomdatenbank von *U. maydis* (MUMDB) angegebenen Sequenz auf. Die Ursache hierfür liegt darin, dass bei der Übertragung der Gensequenz in Proteinsequenz ein Exon/Intron-Übergang gewählt wurde (Position 212 im ORF, dunkelblau in Abb. 2-28), der die Insertion in der Gensequenz in das Intron verlegt, sodass sie in der Proteinsequenz nicht auftaucht. Nimmt man aber den in MUMDB verwendeten Exon/Intron-Übergang an, so ergibt

sich im Protein die in Abbildung 2-28 gezeigte Insertion. Diese liegt in der GTP-Bindetasche, und zwar sehr dicht an dem für die GTP-Hydrolyse essentiellen Glutamin⁶⁷ (in Abb. 2-28 grün dargestellt), das in der dominant aktiven Version gegen Leucin ausgetauscht ist. Durch die Insertion wird die Struktur der Bindetasche wahrscheinlich zerstört. Die Sequenzinsertion in dem von Müller et al. hergestellten Konstrukt pRU11ΔNotI-Ras1^{Q67L} konnte durch Sequenzierung bestätigt werden (nicht gezeigt).

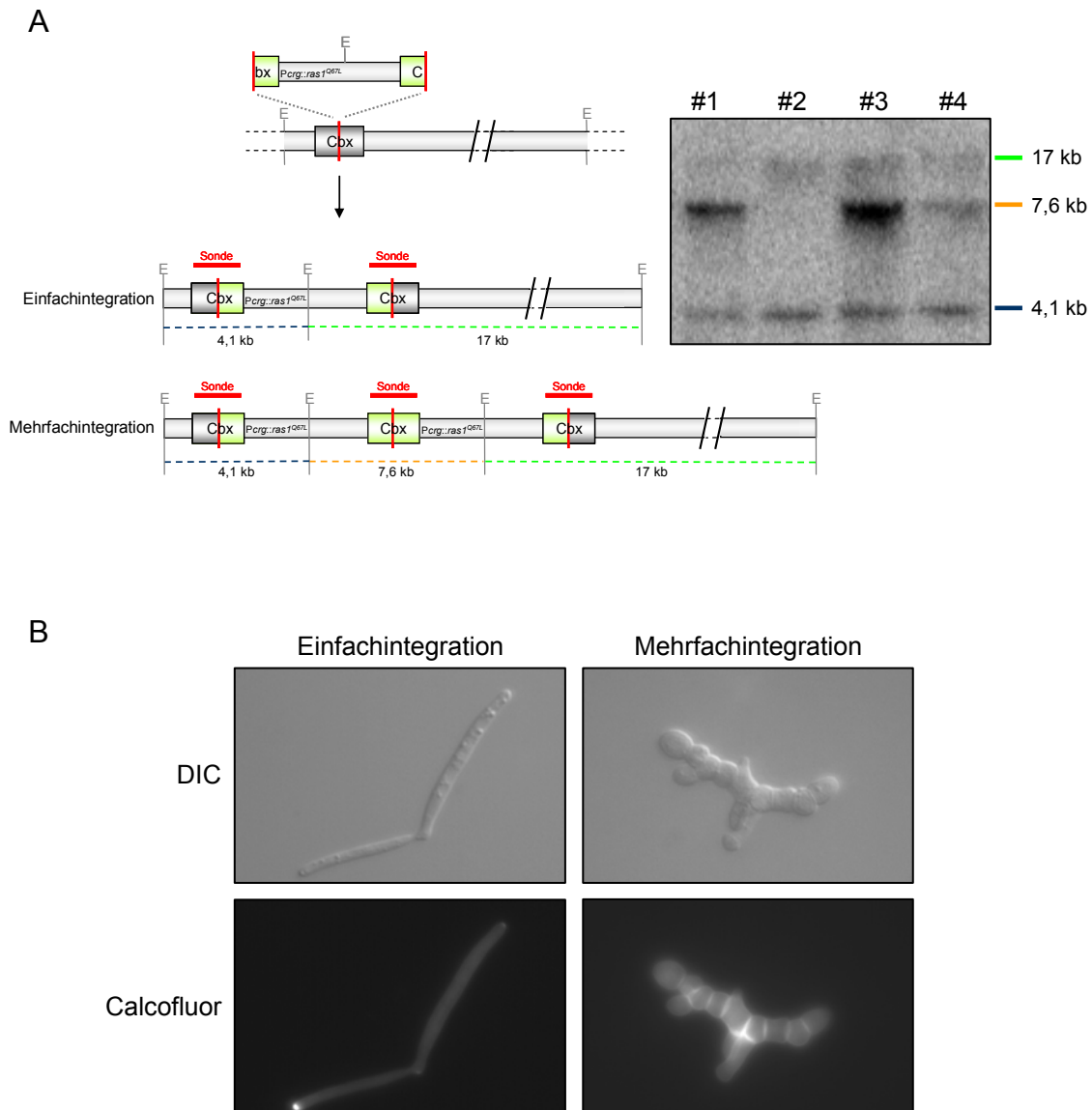


Abbildung 2-29: Expression von *ras1*^{Q67L} vom *crg*-Promotor.

A: Konstruktionsprinzip und Überprüfung der Stämme. Das Konstrukt pRU11ΔNotI-Ras1^{Q67L} wurde im resistenzvermittelnden *cbx*-Allel (grün) linearisiert und in *U. maydis* transformiert. Resistente Transformanten entstehen nur bei Integration in das genomische *cbx*-Allel (grau), das keine Resistenz vermittelt. Für die Southern-Analyse wurden die Stämme mit EcoRV (E) geschnitten, als Sonde wurde *cbx* verwendet. Bei Einfachintegration ergeben sich im Southern-Blot zwei Banden, bei Mehrfachintegration kommt eine dritte Bande hinzu. Die den einzelnen Banden zugrunde liegenden Regionen sind im Schema farblich markiert. B: Morphologie der Stämme nach einem Tag Wachstum in arabinosehaltigem Medium. Bei Einfachintegration des Konstrukts (Klon 2) zeigt sich mit verlängerten dünnen Zellen nur ein schwacher Phänotyp. Die Mehrfachintegration (Klon 1) führt zu starker Septierung und kurzen, rundlichen Zellkompartimenten.

Es musste also angenommen werden, dass das *rasI*^{Q67L}-Allel aus der Arbeit von P. Müller inaktiv ist oder zumindest nicht als konstitutiv aktives Ras-Protein fungiert.

Aus diesem Grunde wurde das Konstrukt pRU11ΔNotI-RasI^{Q67L} unter Verwendung der korrekten Sequenz hergestellt, mit dem *rasI*^{Q67L} vom *crg*-Promotor exprimiert werden kann. Das Konstrukt wurde mit SspI linearisiert und in den *cbx*-Locus eingebracht. Durch Southern-Analyse wurde die Integration in den Locus überprüft. Hierbei zeigte sich ein interessantes Phänomen: Sobald das Konstrukt mehrfach hintereinander in den *cbx*-Locus integriert ist, führt die Induktion der Expression von *rasI*^{Q67L} auf arabinosehaltigem Medium zu einem drastischen Phänotyp (Abb. 2-29). Die Zellen bilden eine Vielzahl von Septen aus, sodass sehr kleine runde Zellkompartimente entstehen, die in Clustern vorliegen. Diese Cluster sind teilweise verzweigt und bilden bizarre Strukturen. In dem Stamm, in dem eine Einfachintegration vorliegt, ist hingegen nur ein sehr schwacher morphologischer Phänotyp auszumachen. Das normale Knospungswachstum wird beibehalten, allerdings sind die Zellen etwas dünner und bilden sehr lange Knospen. Das neu hergestellte echte *rasI*^{Q67L}-Allel hat nun also deutliche Auswirkungen auf die Zellmorphologie von *U. maydis*, deren Stärke allerdings von der Kopienzahl abhängt.

2.8.2 *rasI*^{Q67L} induziert die Expression von *mfa1* über die MAPK-Kaskade

In der Arbeit von Müller et al. wurde für das fehlerhafte *rasI*^{Q67L}-Allel ein starker Einfluss auf die Expression von *mfa1* beschrieben, das für das a1-spezifische Pheromon kodiert. Um zu überprüfen, ob das korrigierte Allel diesen Effekt ebenfalls auslöst, wurde eine Northern-Blot-Analyse durchgeführt. Die Expression von *mfa1* wurde in Gegenwart eines einfach integrierten sowie in Gegenwart eines mehrfach integrierten *rasI*^{Q67L}-Allels untersucht. Zum Vergleich wurde außerdem das von Müller et al. konstruierte Allel (im folgenden *rasI*^{Q67L-PM} genannt) und ein *rasI*-WT-Allel unter Kontrolle des *crg*-Promotors (vgl. Abschnitt 2.6.6) in die Analyse einbezogen. Interessanterweise tritt eine markante Expression von *mfa1* nur im Fall des mehrfach integrierten *rasI*^{Q67L}-Allels auf (Abb. 2-30b). Die Stimulation der *mfa1*-Expression durch *rasI*^{Q67L-PM} hingegen ließ sich nicht reproduzieren. Zur Kontrolle der Versuchsbedingungen wurde daher ebenfalls die Expression der *rasI*-Allele untersucht. In allen vier Expressionsstämmen ist eine deutliche arabinoseabhängige Induktion der Expression zu erkennen.

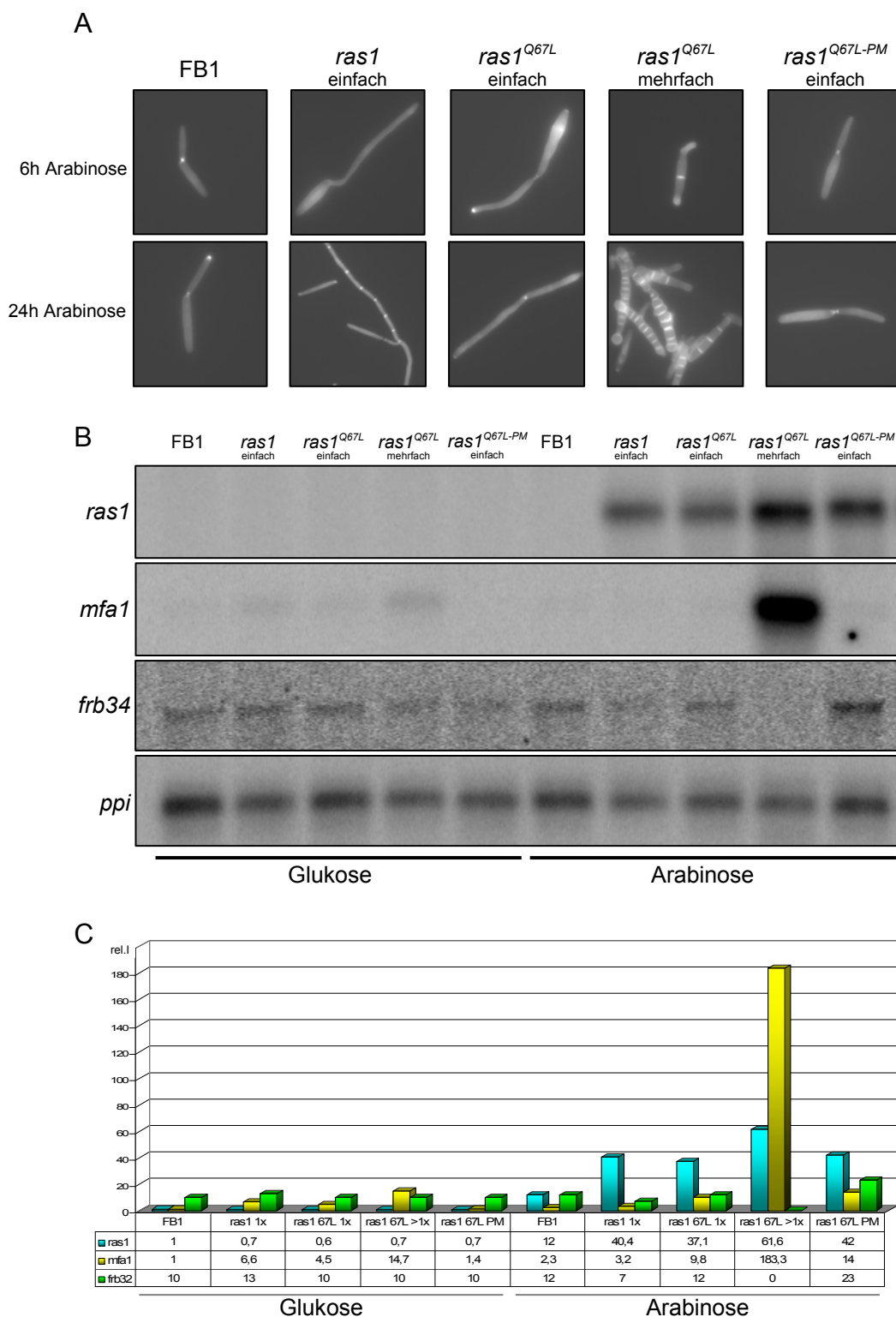


Abbildung 2-30: Einfluss von Ras1^{Q67L} auf die Expression des Pheromogens *mfa1*.

FB1-Stämme, die das *ras1*-Wildtypallel, eine einfache bzw. mehrfache Kopie des *ras1*^{Q67L}-Allels oder das Allel *ras1*^{Q67L-PM} tragen, wurden auf CM-G-Medium angezogen und dann auf CM-A-Medium überführt. Vor Induktion sowie sechs Stunden nach Induktion wurden RNA-Proben entnommen. A: Zellmorphologie der einzelnen Stämme 6 bzw. 24 Stunden nach Induktion. B: Northern-Blot zur Analyse der Expression von *ras1*, *mfa1* und *frb34*. Als Kontrolle diente eine Sonde gegen das konstitutiv exprimierte *ppi*-Gen. C: Quantifizierung der Bandenintensitäten in B unter Verwendung der Software ImageJ (Rasband, 1997). Der Grauwert der erhaltenen Banden wurde gegen die *ppi*-Sonde normiert. Anschließend wurden die erhaltenen Werte für den Stamm FB1 unter reprimierenden Bedingungen auf 1 (*ras1* und *mfa1*) bzw. 10 (*frb34*) gesetzt.

Eine Quantifizierung unter Verwendung der Software ImageJ ergab, dass die drei einfach integrierten Stämme eine sehr ähnliche Expressionsstärke zeigen. In allen drei Fällen wird die Expression des *ras1*-Allels durch den Wechsel der Zuckerquelle um das etwa 40fache verstärkt. Die Mehrfachinsertion des *ras1*^{Q67L}- Allels führt mit einer etwa 60fachen Verstärkung erwartungsgemäß zu einer deutlich höheren Expression (Abb. 2-30c). Obwohl der Stamm *P_{crg}::ras1*^{Q61L-PM} also das Allel korrekt exprimiert, zeigt er nicht den von Müller et al. beschriebenen Effekt (Müller et al., 2003a). Das in dieser Arbeit konstruierte Allel *ras1*^{Q67L} hingegen führt bei Mehrfachintegration zu dem von Müller et al. beschriebenen Effekt auf das *mfa1*-Gen. Allerdings zeigt der Stamm unter diesen Bedingungen eine extreme morphologische Veränderung, die von Müller et al. nicht beschrieben wurde. Um zu überprüfen, ob die Expression von *mfa1* über eine Aktivierung des cAMP-Signalweges oder über die Aktivierung der MAPK-Kaskade verläuft, wurde die Expression des für eine Acyltransferase codierenden Gens *frb34* analysiert. Die Transkription dieses Gens ist bei aktiviertem cAMP-Signalweg erhöht (Brachmann et al., 2001), während sie von der aktivierten MAPK-Kaskade unterdrückt wird (Müller et al., 2003a). Daher kann dieses Gen hier als Reportergen eingesetzt werden, um zwischen der Aktivierung der MAPK-Kaskade und des cAMP-Signalweges zu unterscheiden. Interessanterweise führt die Expression des mehrfach integrierten *ras1*^{Q67L}-Allels zur Repression von *frb34*, was für eine Aktivierung der MAPK-Kaskade unter diesen Bedingungen spricht. Auch dies steht im Widerspruch zu den von Müller et al. veröffentlichten Ergebnissen. Unter Verwendung des gleichen Reportergens wurde dort eine Aktivierung des cAMP-Signalweges durch Ras1^{Q67L} beschrieben. Ras1^{Q67L} ist nach den hier erhaltenen Ergebnissen also anders als bisher vermutet als Aktivator der MAPK-Kaskade zu betrachten.

Interessanterweise führt die Expression des *ras1*^{Q67L-PM}-Allels im Gegensatz zur Expression des *ras1*^{Q67L}-Allels zur Zunahme der *frb34*-Expression (Abb. 2-30c). Dies könnte darauf hindeuten, dass dieses Protein dominant negativ wirkt. Möglicherweise konkurriert das Protein mit dem in der Zelle vorhandenen Ras1-Protein um die Bindung der MAPKKK Kpp4, sodass dann auch das Wildtyp-Protein nicht mehr in der Lage ist, die MAPK-Kaskade zu aktivieren.

Das echte Allel *ras1*^{Q67L} führt interessanterweise nur bei sehr starker Expression zu stark erhöhter *mfa1*-Expression. Gleichzeitig tritt in dieser Situation eine Repression des cAMP-Signalweges und eine sehr starke Hyperseptierung der Zellen auf, die durch Calcofluor-white-Färbung sichtbar wird. Diese Effekte treten hingegen bei Einfachintegration des Konstrukts, wahrscheinlich aufgrund der schwächeren Expression, nicht auf. Allerdings zeigen die Zellen

in diesem Fall eine Hyperpolarisierung (Abb. 2-30a), die beim Allel *rasI*^{Q67L-PM} nicht auftritt. Dies bestätigt erneut, dass dieses Allel inaktiv ist. Anscheinend gibt es einen Schwellenwert der *rasI*^{Q67L}-Expression, der überschritten werden muss, um die massive Induktion der *mfaI*-Expression auszulösen. Diese wird dann aber um einen vielfach höheren Faktor erhöht, als es für das *rasI*^{Q67L}-Allel selbst der Fall ist.

Um eine weitere Bestätigung zu erhalten, dass die Induktion der Expression von *mfaI* über die Aktivierung der MAPK-Kaskade und nicht des cAMP-Signalwegs verläuft, wurde pRU11-Ras1^{Q67L} in mehrfacher Kopie in den *cbx*-Locus von *uacI*- und *kpp4*-Deletionsmutanten integriert. Die Expression von *mfaI* wurde anschließend im Northern-Blot analysiert. Tatsächlich führt die Expression von *rasI*^{Q67L} auch in Abwesenheit der Adenylatzyklase Uac1, also einem defekten cAMP-Signalweg, zu erhöhter *mfaI*-Expression (Abb. 2-31). Die Abwesenheit von *kpp4* hingegen supprimiert die *rasI*^{Q67L}-abhängige *mfaI*-Expression (nicht gezeigt). Für die *rasI*^{Q67L}-abhängige Induktion der Expression von *mfaI* wird also eine funktionierende MAPK-Kaskade benötigt.

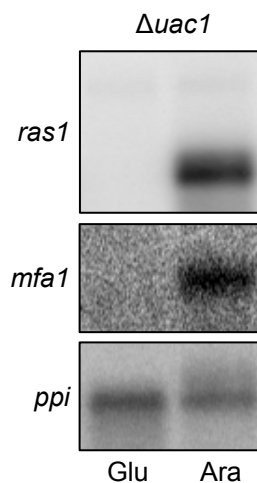


Abbildung 2-31: Die Stimulation der Expression von *mfaI* verläuft unabhängig vom cAMP-Signalweg.

rasI^{Q67L} wurde in $\Delta uac1$ -Mutanten stark überexprimiert. Hierfür wurde der Stamm auf YNB-G-Medium angezogen und anschließend auf YNB-A-Medium überführt. Vor Induktion sowie sechs Stunden danach wurden RNA-Proben entnommen. Die Northern-Analyse ergibt eine starke Induktion der Expression von *mfaI* in Abwesenheit von *uacI*. Als Ladekontrolle diente eine Sonde gegen das konstitutiv exprimierte *ppi*-Gen. Glu: Glukose, Ara: Arabinose.

2.8.3 Der Effekt von Ras1 ist abhängig von der Expressionsstärke

Da der Effekt von konstitutiv aktivem Ras1^{Q67L} erheblich von der Expressionsstärke abhängt, stellte sich die Frage, ob dies für das Wildtyp-Allel auch zutrifft. Um dies zu beantworten, wurde das Konstrukt pRU11 Δ NotI-Ras1 hergestellt und in *U. maydis* transformiert. Anschließend wurden durch Southern-Blot Transformanten mit Einfach- und mit Mehrfachintegration identifiziert (nicht gezeigt).

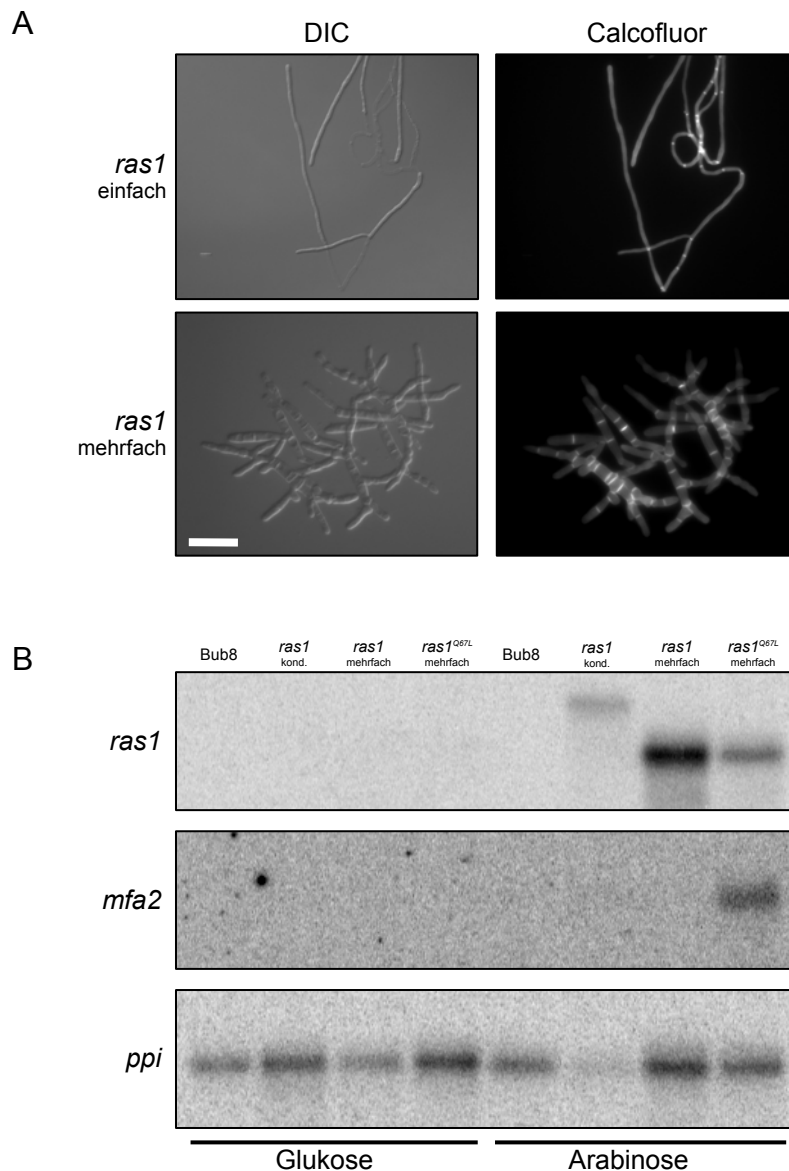


Abbildung 2-32: Einfluss von Ras1 auf die Zellmorphologie und die Expression des Pheromogens *mfa2*.

A: Zellmorphologie von Stämmen, die das *ras1*-Wildtyp-Allel einfach bzw. mehrfach integriert tragen, nach 24h Wachstum unter induzierenden Bedingungen. Der Größenmaßstab entspricht einer Länge von 10 µm. B: Northern-Blot. Bub8-Stämme, die das *ras1*-Wildtypallel bzw. das *ras1*^{Q67L}-Allel mehrfach integriert tragen sowie der konditionale *ras1*-Stamm wurden auf YNB-G-Medium angezogen und anschließend auf YNB-A-Medium überführt. Vor Induktion sowie sechs Stunden danach wurden RNA-Proben entnommen. Als Ladekontrolle diente eine Sonde gegen das konstitutiv exprimierte *ppi*-Gen. Nur das *ras1*^{Q67L}-Allel induziert die Expression von *mfa2*. Die unterschiedlichen Größen der Transkripte von *ras1* sind auf die Unterschiede in der Konstruktion des konditionalen *ras1*-Stammes und des *Pcrg::ras1*-Stammes zurückzuführen. Im letzteren Fall ist hier ein Terminationssignal im Vektor pRU11ΔNotI vorhanden, das zu einem kürzeren Transkript führt.

Die Induktion der Expression von *ras1* in YNB-A-Medium führte zu einem erstaunlichen Ergebnis: Zellen, bei denen das Wildtyp-Allel einfach in den *cbx*-Locus integriert vorliegt, zeigen das vom konditionalen *ras1*-Stamm her bekannte filamentöse Wachstum (Abb. 2-32a). Sobald eine Mehrfachintegration vorliegt, bilden sich jedoch auf arabinosehaltigem Medium Cluster von verdickten, unseparierten, stark septierten Zellen. Der Phänotyp ist dem von

Zellen, die das aktive *rasI*^{Q67L}-Allel mehrfach integriert tragen, sehr ähnlich. Das Wildtypallel führt also ebenso wie das konstitutiv aktive Allel zu starker Hyperseptierung, allerdings ist dies in beiden Fällen nur bei Mehrfachintegration zu beobachten.

Um herauszufinden, ob auch das Wildtypallel bei Mehrfachintegration in der Lage ist, die Pheromonexpression zu stimulieren, wurde eine Northern-Blot-Analyse durchgeführt. Für beide Allele wurde hierfür ein Stamm mit einer Mehrfachintegration ausgewählt. Außerdem wurde in die Analyse der konditionale *rasI*-Stamm einbezogen. Interessanterweise tritt auch bei Mehrfachintegration die verstärkte Expression des Pheromons nur im Fall des konstitutiv aktiven Allels auf, während sich die morphologischen Phänotypen der beiden Stämme unter diesen Bedingungen sehr ähneln (Abb. 2-32b). Für die Stimulation der Pheromonexpression reicht also auch die starke Expression der Wildtypversion nicht aus, das Protein muss im aktivierten Zustand vorliegen.

Die durch Ras1 und Ras1^{Q67L} hervorgerufene starke Septierung geht einher mit einer deutlichen Abnahme des Koloniewachstums (Abb. 2-33). Sowohl die Repression als auch starke Überexpression von *rasI* interferiert also mit dem Wachstum von *U. maydis*.

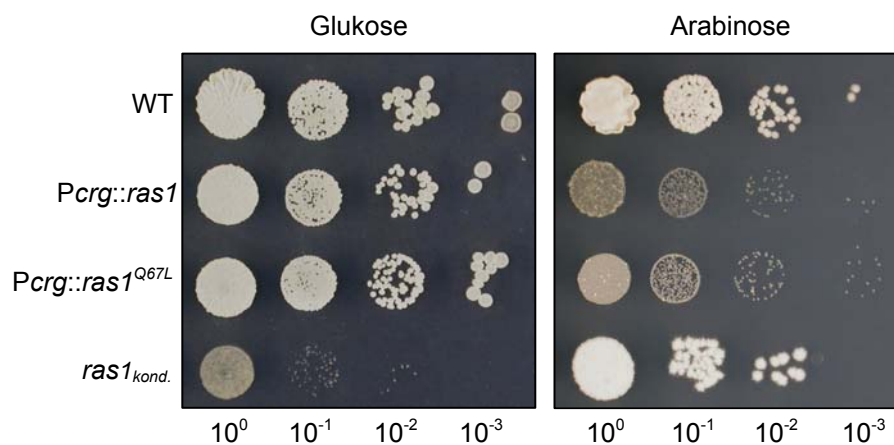


Abbildung 2-33: Lebensfähigkeit von *rasI*-Mutanten.

Übernachtskulturen der angegebenen Stämme wurden in 10er-Schritten verdünnt und je 5 µL wurden auf YNB-Platten, die mit 2% Glukose bzw. Arabinose versetzt waren, getropft und für 48 Stunden bei 28°C inkubiert. Die auf arabinosehaltigem Medium induzierte Expression von *rasI*^{Q67L} und von *rasI* im Stamm pRU11ΔNotI-Ras1 führt zu deutlich reduzierter Koloniebildung. Die Expression von *rasI* im konditionalen *rasI*-Stamm dagegen führt zu filamentösem Wachstum, es bilden sich weiße flauschige Kolonien. Bei Anwesenheit von Glukose wachsen alle Stämme bis auf den konditionalen *rasI*-Stamm in mit dem Wildtyp vergleichbarer Geschwindigkeit und Morphologie. Die Abwesenheit von Ras1 führt zu einem Wachstumsstopp.

Um auszuschließen, dass der durch Hyperseptierung charakterisierte Phänotyp des Stammes, in dem das *rasI*-Allel mehrfach integriert ist, auf einen anderen Effekt als die durch die Mehrfachintegration verstärkte Expression des Allels zurückzuführen ist, wurde der Stamm zusätzlich auf YEP-Medium mit Arabinose (YEP-A) und Minimal-Glutamin-Medium mit Arabinose (MM-A) analysiert. Auf diesen Medien ist die Expression vom *crg*-Promotor zwar auch induziert, aber deutlich schwächer als auf YNB-A-Medium (Abb. 2-34b,c). Interessanterweise gleicht sich das Verhalten des konditionalen *rasI*-Stammes und des Stammes *Pcrg::rasI*, der eine mehrfache Integration von pRU11ΔNotI-Ras1 trägt, auf YEP-A-Medium und MM-A-Medium an. In diesen Fällen zeigen beide Stämme hyperpolarisiertes Wachstum. Allerdings sind die Filamente im Stamm *Pcrg::rasI* deutlich länger als konditionalen Ras1-Stamm (Abb. 2-34a). Sowohl im konditionalen *rasI*-Stamm als auch im *Pcrg::rasI*-Stamm ist die Expression in Zellen, die auf YNB-A-Medium überführt wurden, mehr als doppelt so stark wie nach Überführung in YEP-A-Medium (Abb. 2-34b,c). Außerdem ist auf beiden Medien die Expression im Stamm *Pcrg::rasI* deutlich stärker als im konditionalen *rasI*-Stamm. Der stark septierte Phänotyp ist also auf eine stärkere Expression zurückzuführen. Aufgrund der verschiedenen verwendeten Konstrukte unterscheiden sich in den Stämmen die Größen der Transkripte. Das Transkript von *rasI* am Wildtyp-Locus ist am längsten. Dieses Transkript ist in Abbildung 2-34b aufgrund der geringen Expressionsstärke nur als Schatten zu erkennen (siehe Pfeilkopf), verschwindet aber im konditionalen *rasI*-Stamm. Das vom *crg*-Promotor abhängige Transkript im konditionalen *rasI*-Stamm ist deutlich kürzer. Hier liegt aufgrund der homologen Integration in den *rasI*-Locus das gleiche Terminationssignal wie im Wildtyp vor. Daraus lässt sich schließen, dass im Wildtyp der Startpunkt der Transkription deutlich stromaufwärts liegt. Das Transkript im Wildtyp besitzt also einen langen untranslatierten 5'-Bereich, der im konditionalen Stamm durch Einbringung des *crg*-Promotors entfernt wurde. Das Transkript im Stamm *Pcrg::rasI* ist noch kürzer, da hier zusätzlich noch ein unnatürliches Terminationssignal in der Sequenz des Vektors pRU11ΔNotI vorliegt.

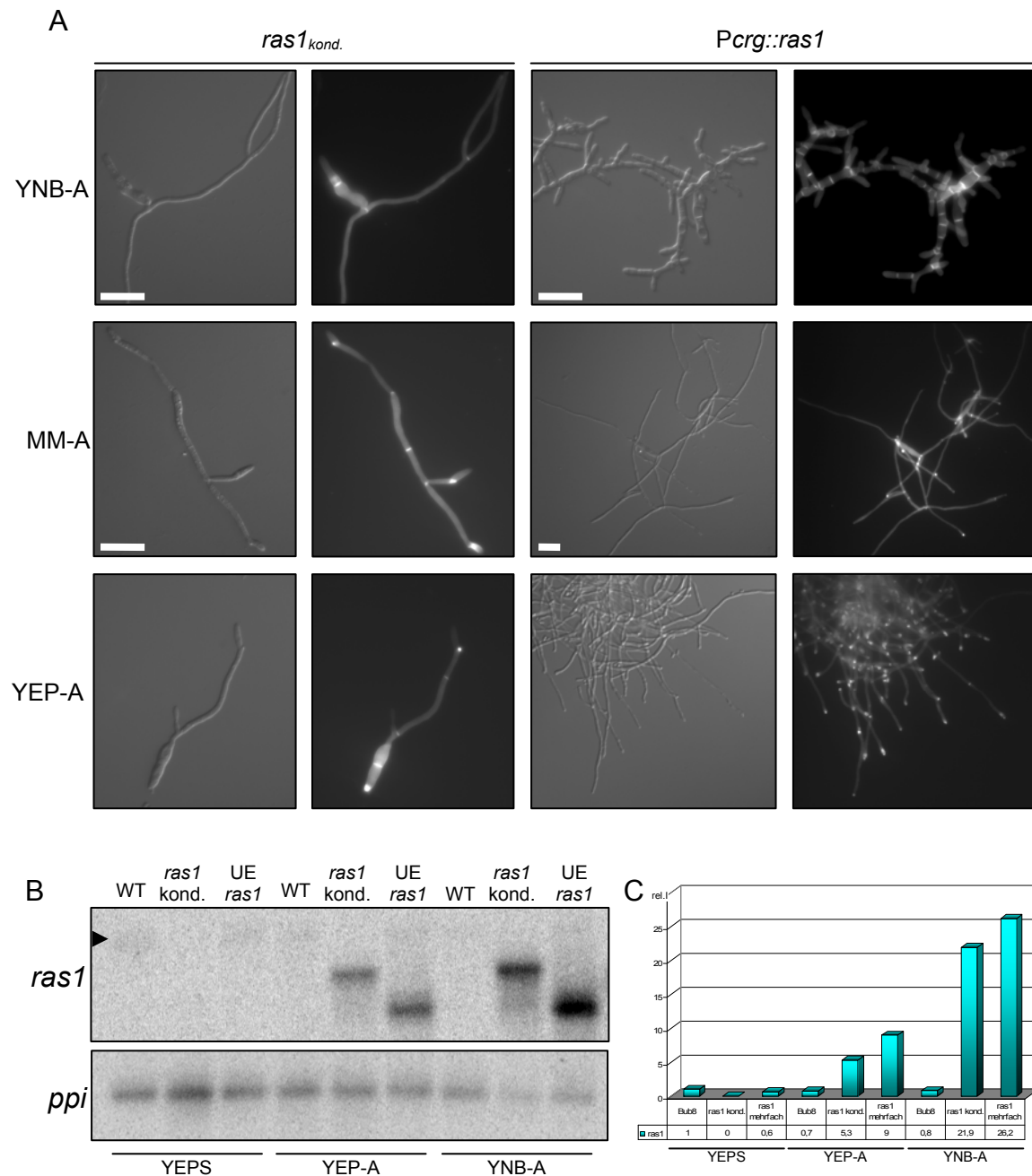


Abbildung 2-34: Überexpression von *ras1* auf verschiedenen Medien.

ras1 wurde im konditionalen *ras1*-Stamm und vom Vektor pRU11ΔNot-Ras1 (mehrfach integriert) durch Induktion in Anwesenheit von Arabinose in verschiedenen Medien induziert. A: Zellmorphologie nach 24 Stunden Induktion. Während der konditionale *ras1*-Stamm in allen drei Medien filamentös wächst, zeigt sich im mehrfach integrierten pRU11ΔNotI-Ras1-Stamm auf YNB-A-Medium der durch Hyperseptierung charakterisierte Phänotyp. Auf den beiden anderen Medien wächst auch dieser Stamm filamentös. Größenmarker: 10 μM. B, C: Northern-Analyse der Expression von *ras1*. Die Stämme wurden in YEPS-Medium angezogen und anschließend in YEP-A- bzw. YNB-A-Medium überführt. Zuvor sowie sechs Stunden später wurde aus den Kulturen RNA extrahiert und im Northern Blot analysiert. Als Ladekontrolle diente das Transkript des konstitutiv exprimierten *ppi*-Gens. Die Längen der *ras1*-Transkripte unterscheiden sich abhängig von den verwendeten Konstrukten. Der Pfeilkopf deutet die Bandenhöhe des Wildtyptranskripts an. C: Relative Bandenintensitäten (rel.I) des *ras1*-Transkripts im Vergleich zum *ppi*-Transkript, gemessen unter Verwendung der Software ImageJ (Rasband, 1997). Die Expression von *ras1* im auf YEPS gewachsenen Wildtypstamm Bub8 wurde auf 1 gesetzt.

2.8.4 Die morphologischen Effekte von Ras1 werden unabhängig von Cdc42 und Rac1 vermittelt

Um zu ermitteln, ob die von Ras1 induzierten morphologischen Umwandlungen über die Aktivierung von Cdc42 oder Rac1 vermittelt werden, wurden *ras1* und *ras1*^{Q67L} unter Kontrolle des *crg*-Promotors in die *cdc42*- und *rac1*-Deletionsmutanten eingebracht. Die Überexpression von konstitutiv aktivem Ras1^{Q67L} führt überraschenderweise in beiden Stammhintergründen zu starker Hyperseptierung (Abb. 2-35). Die von Ras1^{Q67L} ausgehende starke Septenbildung ist also weder von Cdc42 noch von Rac1 abhängig. Allerdings könnte es sich hier auch um eine redundante Funktion der beiden G-Proteine handeln, die von beiden Proteinen übernommen werden kann. Ein ähnliches Bild ergibt sich bei Expression von *ras1*: Diese führt in *cdc42*-Deletionsmutanten weiterhin zur Filamentbildung (Abb. 2-35). Auch in *rac1*-Deletionsmutanten ist erstaunlicherweise ein deutliches Längenwachstum bei Expression von *ras1* zu beobachten.

Allerdings sind die gebildeten Filamente deutlich dicker als im Wildtyp-Hintergrund. Rac1 ist also nicht direkt an dem Ras1-abhängigen Signalweg, der zur Hyperpolarisierung der Zelle führt, beteiligt. Es wird aber für die Ausbildung der normalen schlanken Form des Filaments benötigt.

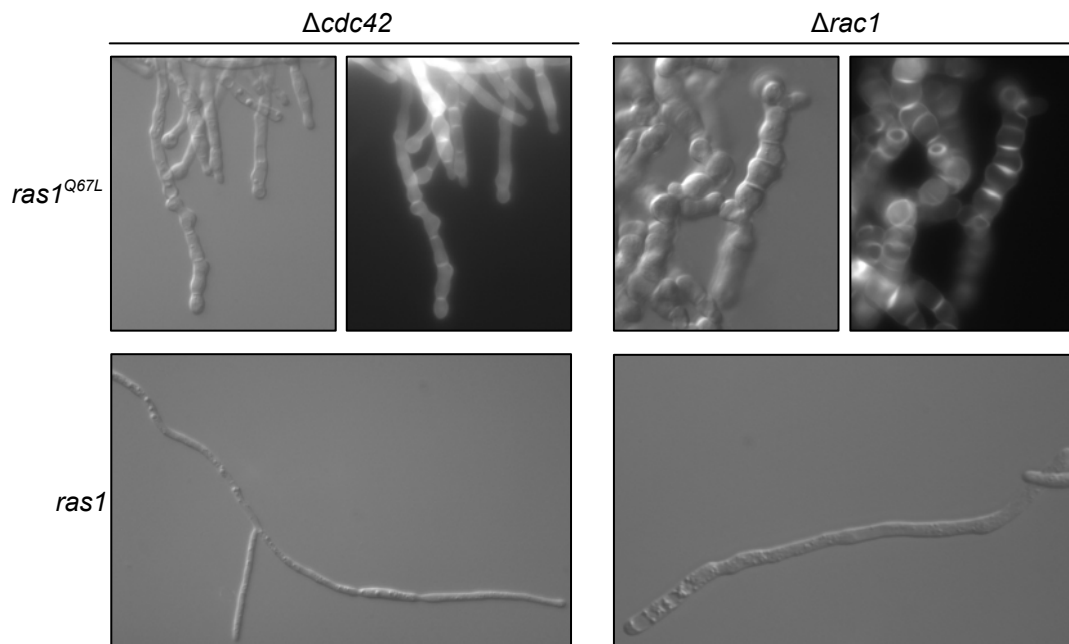


Abbildung 2-35: Die Effekte von Ras1 werden unabhängig von Cdc42 und Rac1 vermittelt.

Das konstitutiv aktive *ras1*^{Q67L} und das *ras1*-Wildtypallel wurden vom *crg*-Promotor in *cdc42*- und *rac1*-Deletionsmutanten exprimiert. In beiden Stämmen führt die Expression des konstitutiv aktiven Allels zur Hyperseptierung. Auch die *ras1*-abhängige Filamentbildung tritt bei Abwesenheit von Cdc42 und bei Abwesenheit von Rac1 auf. Allerdings ist das Filament in Abwesenheit von Rac1 deutlich dicker.

2.9 Ras1 lokalisiert an der Zellmembran

Um die intrazelluläre Lokalisierung von Ras1 und Ras1^{Q67L} zu bestimmen, wurden GFP-Fusionen der beiden Proteine hergestellt. Hierfür wurde der Leserahmen in den Vektor pCrg-GFP-Ala6-MXN eingebracht, sodass *ras1* und *ras1*^{Q67L} unter Kontrolle des *crg*-Promotors als N-terminale GFP-Fusion exprimiert werden können.

Die Expression von GFP-Ras1 führt ähnlich wie die Expression des unfusionierten Wildtyp-Allels zur Filamentbildung der Zellen (Abb. 2-36). Eine starke Septierung, wie sie beim Wildtyp-Allel zumindest auf YNB-A-Medium vorkommt, ist allerdings nicht zu beobachten. Das GFP-Signal lokalisiert deutlich an der Zelloberfläche. Dies gilt sowohl für die Zelle selbst als auch für den filamentösen Auswuchs. Es tritt keine Akkumulation an der Spitze des Filaments auf. 24 Stunden nach Beginn der Expression des Fusionsproteins sind in den Filamenten Septen zu erkennen, an denen eine deutliche Akkumulation des Fusionsproteins zu erkennen ist.

Das GFP-Fusionsprotein von Ras1^{Q67L} zeigt ebenfalls eine deutlich abgeschwächte Funktionalität. Es kommt nicht zur Ausbildung von stark septierten Zellclustern, wie sie bei Expression von Ras1^{Q67L} gebildet werden. Stattdessen findet ein hyperpolarisiertes Wachstum statt, das aber schwächer als im Wildtyp-GFP-Ras1-Protein ausgeprägt ist.

Die Lokalisation des aktiven Ras1^{Q67L}-Allels unterscheidet sich nicht von der des Wildtyp-Allels. Auch hier markiert das Fusionsprotein deutlich die Zellmembran. Ein deutlicher morphologischer Unterschied ist allerdings festzustellen: Während bei Expression des Wildtyp-GFP-Fusionsproteins die Zellen nur an einem Pol mit dem filamentösen Wachstum beginnen, findet das hyperpolarisierte Wachstum bei Überexpression des dominant aktiven Fusionsproteins an beiden Zellpolen statt. Außerdem bildet sich in diesem Fall häufig bereits in den ersten sechs Stunden ein Septum in der Zellmitte, an dem das Protein in großen Mengen zu finden ist. Statt eines unipolaren Wachstums findet hier ein bipolares Spitzenwachstum statt. Nach 24 Stunden Expression der Fusionsproteine sind im Fall des GFP-Ras1^{Q67L}-Proteins die Filamente deutlich kürzer als im Wildtyp und es finden sich deutlich mehr Septen.

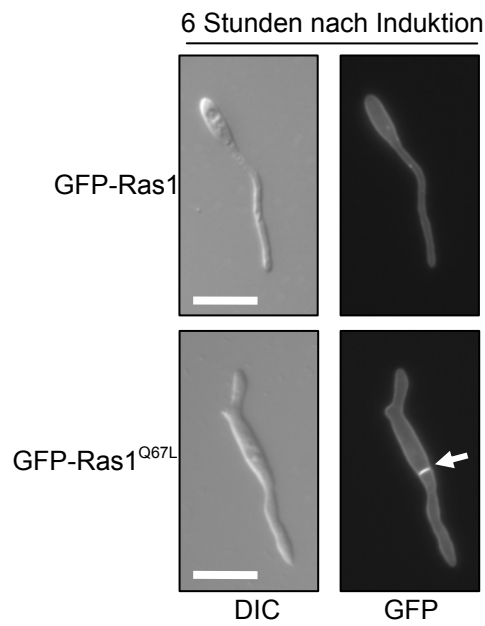
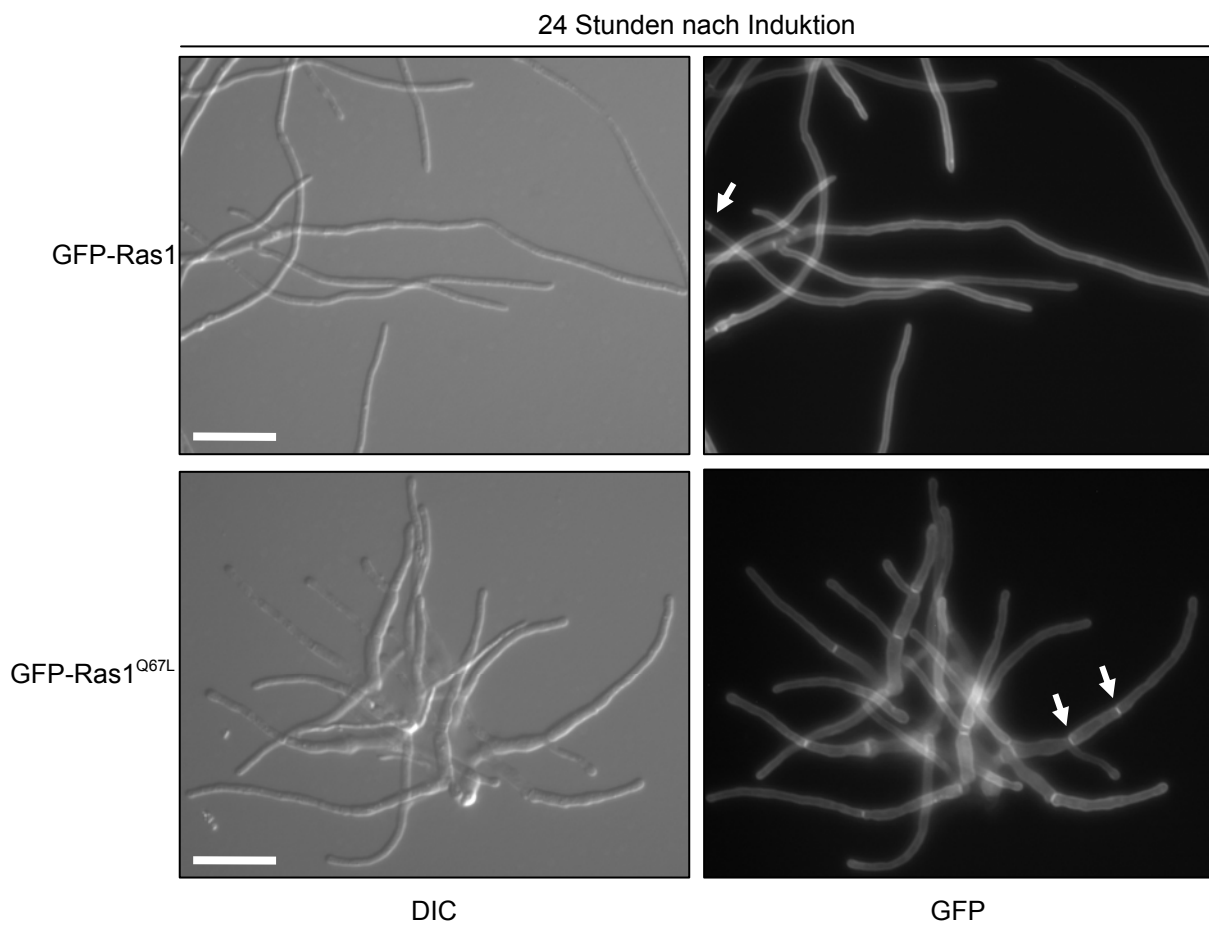


Abbildung 2-36: Lokalisation von Ras1 und Ras1^{Q67L}. Die Expression der Fusionsproteine GFP-Ala6-Ras1 bzw. GFP-Ala6-Ras1^{Q67L} wurde durch Wachstum in YNB-A-Medium induziert. Sechs bzw. 24 Stunden nach Induktion wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Pfeile markieren Septen, an denen die Fusionsproteine lokalisieren. Der Maßstab entspricht einer Länge von 10 μ M.



2.10 Die Expression von *ras2* ist abhängig vom cAMP-Signal

In *U. maydis* wurden Ras1 und Ras2 als Regulatoren des MAPK-Moduls und des cAMP-Signalweges beschrieben (Müller et al., 2003a). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Expression der *ras*-Gene von der Aktivität dieser Signalwege abhängig ist. Eine solche Reaktion, die auf eine Feedback-Regulation hindeuten würde, würde die Bedeutung der Ras-Proteine für diese Signalwege weiter untermauern.

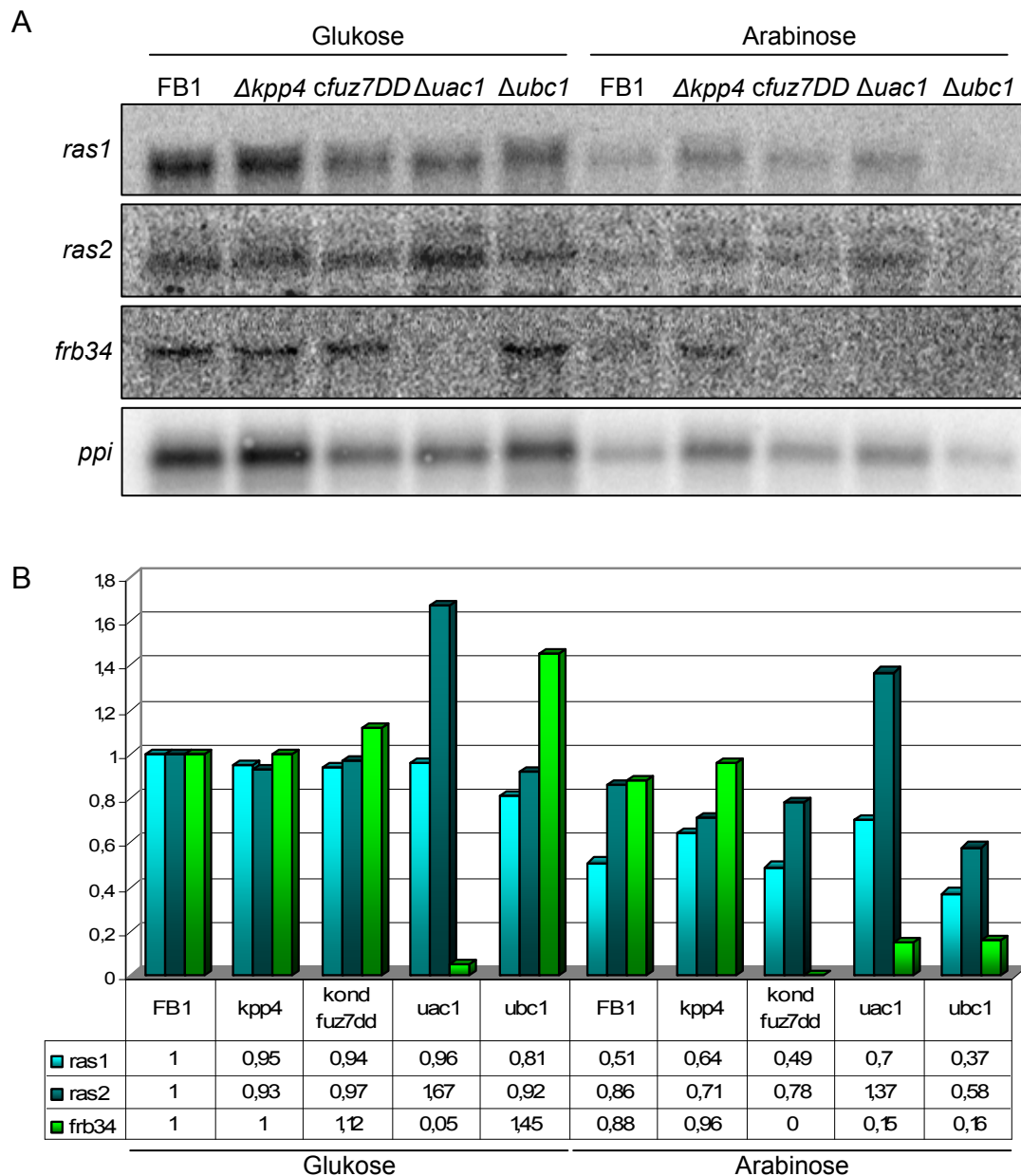


Abbildung 2-37: Der cAMP-Signalweg reguliert die Expression von *ras2*.

A: Die Expression von *ras1* und *ras2* wurde in den angegebenen Stammhintergründen durch Northern-Analyse untersucht. Außerdem wurde zur Stammkontrolle eine Sonde gegen *frb34* eingesetzt. Als Ladekontrolle diente eine Sonde gegen das konstitutiv exprimierte *ppi*-Gen. B: Relative Bandenintensitäten (rel.I) des *ras1*-, des *ras2*- und des *frb34*-Transkripts im Vergleich zum *ppi*-Transkript, gemessen unter Verwendung der Software ImageJ (Rasband, 1997). Die Expressionsstärke der drei Transkripte in auf glukosehaltigem Medium gewachsenen Wildtyp wurde auf 1 gesetzt. In Abwesenheit von Uac1 steigt die Expression von *ras2* etwa auf das 1,5 fache an.

Zu diesem Zweck wurde die Transkription von *ras1* und *ras2* durch Northern Blot in den Stämmen FB1 Δ *uac1*, FB1 Δ *ubc1*, FB1 Δ *kpp4* und FB1*fuz7DD*_{kond} (Müller et al., 2003b) analysiert. Die Abwesenheit von Uac1 unterbricht den cAMP-Signalweg, bei Abwesenheit von Ubc1 ist dieser konstitutiv aktiv. In Abwesenheit von Kpp4 ist der MAPK-Signalweg inaktiv, bei Expression von konstitutiv aktivem Fuz7DD hingegen aktiv. Der Stamm FB1*fuz7DD*_{kond} exprimiert das konstitutiv aktive Fuz7DD unter Kontrolle des *crg*-Promotors. Da sowohl die An- als auch die Abwesenheit von Fuz7DD getestet werden sollte, wurde das Experiment in allen Stämmen sowohl mit Glukose als auch mit Arabinose als Kohlenstoffquelle durchgeführt. Neben der Expression der *ras*-Gene wurde auch die Expression von *frb34* analysiert. Dieses Gen wurde hier als Reportergen verwendet. Seine Expression wird bei Anwesenheit von cAMP induziert (Brachmann et al., 2001), durch eine aktive MAPK-Kaskade hingegen reprimiert (Müller et al., 2003a). Dadurch lassen sich in diesem Experiment die erwarteten Aktivitäten der beiden Signalwege in den verschiedenen Stämmen überprüfen. So ist in Abwesenheit der Adenylatzyklase Uac1 der cAMP-Signalweg inaktiv und die Expression von *frb34* wird, womöglich durch die Aktivität der MAPK-Kaskade, unterdrückt. Auch in Anwesenheit von Fuz7DD ist die Expression von *frb34* unterdrückt, da hier die MAPK-Kaskade konstitutiv aktiviert ist. In Anwesenheit von Ubc1 hingegen ist der cAMP-Signalweg aktiv und die Expression von *frb34* steigt an. Dass dies bei den auf Arabinose gewachsenen Zellen nicht zu erkennen ist, könnte daran liegen, dass in *U. maydis* ein hoher cAMP-Spiegel ein Signal für das Vorhandensein von Glukose im Medium ist. Deshalb wächst eine Ubc1-Mutante auf arabinosehaltigem Medium sehr schlecht, denn der Stoffwechsel des Organismus wird durch das cAMP-Signal auf die Verwertung von Glukose eingestellt, sodass die im Medium vorhandene Arabinose nicht verwertet wird. Diese Hungersituation wirkt sich auf das Expressionsverhalten des Stammes aus, sodass hier nur sehr wenig RNA isoliert werden konnte.

Während die Expression von *ras1* in keinem Fall eine deutliche Änderung zeigt, ist eine deutliche Erhöhung der Transkriptmenge von *ras2* in Abwesenheit von Uac1 sowohl auf glukosehaltigem als auch auf arabinosehaltigem Medium zu erkennen (Abb. 2-37). Die Quantifizierung der relativen Bandenintensitäten ergab jeweils eine Erhöhung der Transkriptmenge auf das etwa 1,6-fache. Die Expression von Ras2 reagiert also anscheinend auf die Aktivität des cAMP-Signalwegs. Ist der Signalweg inaktiv, wird die Expression erhöht.

Dieses Ergebnis ist insofern überraschend, als Ras2 eher als Aktivator der MAPK-Kaskade angesehen wird (Lee and Kronstad, 2002). Allerdings könnte es eine Erklärung für die bisher unverstandene Vernetzung der beiden Signalwege liefern: Die Abwesenheit von cAMP führt zu erhöhter Expression von Ras2. Dadurch wird die MAPK-Kaskade aktiviert, die zu filamentösem Wachstum führt.

3 Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Funktionen der kleinen G-Proteine Rac1, Cdc42, Ras1 und Ras2 in *Ustilago maydis* näher untersucht. Ein besonderer Schwerpunkt lag dabei auf der Charakterisierung von Rac1. Dieses G-Protein ist dem bereits untersuchten Protein Cdc42 nahe verwandt. Die Funktionen dieser beiden Proteine wurden vergleichend analysiert und ihre redundanten Funktionen wurden aufgedeckt.

Desweiteren wurden die Funktionen der Ras-Proteine in *Ustilago maydis* charakterisiert. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf Ras1 gelegt, da Ras2 bereits in der Gruppe von J. Kronstad ausführlicher untersucht worden war (Lee and Kronstad, 2002). Es zeigte sich, dass Ras1 einen deutlich größeren Einfluss auf die Zellmorphologie ausübt, als bisher angenommen, und dass die Abwesenheit des Proteins in einem Defekt in der Zellpolarität und der Kernverteilung resultiert und das Zellwachstum stark behindert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Ras1 entscheidende Funktionen in der Vakuolenfusion hat, die es über die Aktivierung von Rac1 ausübt.

3.1 Weder Cdc42 noch Rac1 sind in *Ustilago maydis* essentiell

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass weder die Deletion von *cdc42* noch die Deletion von *rac1* in *Ustilago maydis* letal ist, dass aber die Anwesenheit von zumindest eines der beiden G-Proteine essentiell ist. Die beiden Proteine führen also teilweise redundante und für die Zelle lebenswichtige Funktionen aus. Beim Ausfall einer der beiden G-Proteine kann das andere einspringen und diese essentiellen Funktionen komplett übernehmen. Der stark unterschiedliche Phänotyp der einzelnen Deletionsmutanten zeigt aber, dass jedes der beiden Proteine außerdem Funktionen ausübt, die von dem anderen Protein nicht übernommen werden können. So hat Cdc42 eine entscheidende Funktion bei der Bildung des sekundären Septums während der Zellteilung. Rac1 hingegen steuert die Organisation der Zellmorphologie und die Knospung.

Cdc42 galt lange Zeit als essentielles Protein in eukaryotischen Organismen (Johnson, 1999). Diese Ansicht resultierte hauptsächlich aus Studien an *S. cerevisiae* und *S. pombe*. Diese Organismen besitzen jedoch kein Rac-Homolog, das bei Ausschalten von Cdc42 teilweise

dessen Funktionen übernehmen könnte. Mittlerweile sind lebensfähige *cdc42*-Mutanten in mehreren Organismen beschrieben worden. Der erste Hinweis auf die Lebensfähigkeit eukaryotischer Zellen in Abwesenheit von Cdc42 ergab sich aus der Untersuchung von embryonalen Stammzellen der Maus (Chen et al., 2000). Diese zeigen in Abwesenheit von Cdc42 normale Teilungsraten. Allerdings ist das Protein unverzichtbar für die embryonale Entwicklung der Maus, und die Struktur des Aktin-Zytoskeletts ist in den embryonalen Stammzellen deutlich beeinträchtigt. Der erste beschriebene Organismus, der in allen Entwicklungsstadien in Abwesenheit von Cdc42 lebensfähig ist, der humanpathogene Pilz *Wangiella dermatitidis* (Ye and Szaniszlo, 2000). Die *cdc42*-Deletionsmutanten sind etwas schlanker als der Wildtyp, zeigen aber keine Wachstumsdefekte. Allerdings wird hier oft ein Querseptum in die Mutterzellen eingezogen. Jedes entstehende Kompartiment enthält dann einen Kern. Dies erinnert eher an die Deletion von *rac1* als von *cdc42* in *U. maydis*. Die Aufgabenverteilung zwischen den beiden G-Proteinen ist hier anscheinend anders gelöst. Auch in *Claviceps purpurea* konnte kürzlich gezeigt werden, dass *cdc42* nicht essentiell ist (Scheffer et al., 2005). Hier führt die Deletion zu stärkeren Verzweigungen der Zelle und zu verfrühter Konidienbildung. Außerdem ist die Pathogenität der Deletionsmutante in einem frühen Stadium blockiert. In allen bisher beschriebenen Fällen ist aber ein Rac1-Protein in der Zelle vorhanden, das möglicherweise einige Funktionen von Cdc42 übernehmen kann. Allerdings ist diese funktionelle Redundanz nicht in allen Organismen gegeben: Im dimorphen Ascomyceten *Penicillium marneffei* existiert sowohl ein *cdc42*- als auch ein *rac1*-Homolog (Boyce et al., 2001; Boyce et al., 2003). Dennoch konnte in diesem Organismus keine Deletion von *cdc42* erzeugt werden. Sie ist daher höchstwahrscheinlich letal (Boyce et al., 2001). Trotz der starken Homologie haben die G-Proteine in verschiedenen Organismen also anscheinend unterschiedliche Spezialaufgaben. Ein interessantes Beispiel hierfür ist auch die heterologe Expression des konstitutiv negativen *cdc42*-Allels von *P. marneffei* im filamentösen Ascomyceten *Aspergillus nidulans* (Boyce et al., 2001): Das Protein unterdrückt hier die Konidienbildung komplett. Im Ascomyceten *Claviceps purpurea* (Scheffer et al., 2005) hat dominant negatives Cdc42 genau den gegenteiligen Effekt. Die Signale, die zu ähnlichen morphologischen Umwandlungen führen, werden also in den Pilzen durch unterschiedlich geschaltete Signalkaskaden vermittelt.

Im Gegensatz zur Deletion von *cdc42* wurde bisher noch kein pilzlicher Organismus beschrieben, in dem die Deletion von *rac1* letal ist. Insofern überrascht die Lebensfähigkeit der *rac1*-Deletionsmutante in *U. maydis* nicht. In mehreren Pilzen wurde *rac1* bereits genauer untersucht. Im Ascomyceten *Yarrowia lipolytica* hat die Deletion von *rac1* wie in *U. maydis*

einen Effekt auf die Zellmorphologie, nicht aber auf die Paarungsreaktion (Hurtado et al., 2000). Außerdem ist auch hier das filamentöse Wachstum abhängig von Rac1. In *P. marneffei* ist Rac1 am polaren Wachstum vor allem während der Konidienbildung beteiligt (Boyce et al., 2003). Außerdem wird Rac1 hier für das Hyphenwachstum benötigt, nicht aber für das hefeartige Wachstum. Weitere Rac1-Homologe wurden in *Colletotrichum trifolii* (Chen and Dickman, 2004) und *Cryptococcus neoformans* (Vallim et al., 2005) beschrieben. Da für andere Organismen als *U. maydis* bisher noch keine Doppelmutanten von *cdc42* und *rac1* beschrieben wurden, bleibt die Frage noch offen, ob sich eine eventuelle funktionelle Redundanz zwischen den beiden Proteinen in anderen Organismen auf ähnliche zelluläre Funktionen wie in *U. maydis* bezieht.

3.2 Cla4 ist ein Effektor von Rac1

Mehrere experimentelle Erkenntnisse deuten daraufhin, dass Cla4 in *Ustilago maydis* ein Effektor von Rac1 ist. Im Hefe-Zwei-Hybrid-System interagiert das Protein sowohl mit Cdc42 als auch mit Rac1 (Leveleki et al., 2004). Der morphologische Phänotyp einer *cla4*-Deletionsmutante ähnelt aber sehr stark dem einer *rac1*-Deletionsmutante. Zudem ist auch die Überexpression einer verkürzten Form von Cla4, in der die Autoinhibition aufgehoben ist, letal (Leveleki et al., 2004). Der Phänotyp ähnelt hier sehr dem von konstitutiv aktivem Rac1^{Q61L}. Dies spricht dafür, dass Rac1 über Cla4 Einfluss auf die Zellmorphologie nimmt. Ein weiteres Indiz hierfür ist die Beobachtung, dass in *cla4*-Deletionsmutanten die *rac1*-abhängige Filamentbildung ausbleibt. Allerdings gibt die Beobachtung, dass die gleichzeitige Deletion von *rac1* und *cla4* zu einem weitaus stärkeren Phänotyp führt, als die Einzeldelationen, einen Hinweis darauf, dass Rac1 nicht der einzige Aktivator von Cla4 ist. Das Bild des regulatorischen Netzwerks wird noch komplexer durch die Tatsache, dass Cla4 auch nicht der einzige Effektor von Rac1 sein kann: Auch in *cla4*-Deletionsmutanten ist die Expression von dominant aktivem *rac1*^{Q61L} letal.

Cla4 wurde zum ersten Mal in *S. cerevisiae* isoliert und ist dort als ein Effektor von Cdc42p beschrieben worden (Cvrckova et al., 1995). Allerdings könnte dies ein Sonderfall sein, der auf die Tatsache zurückzuführen ist, dass dieser Organismus kein *rac1*-Homolog besitzt: Neben *U. maydis* wurde bereits in anderen Organismen eine Funktion von Cla4 unterhalb von Rac1 beschrieben. So ist in *Y. lipolytica* neben Rac1 auch Cla4 notwendig für das filamentöse

Wachstum (Szabo, 2001). In *Cryptococcus neoformans* interagiert eine Ste20-artige Kinase mit aktivem Rac1, die allerdings mit Cla4 näher verwandt ist als mit ihrem Namensgeber Ste20 (Vallim et al., 2005). Eine Funktion von Cla4 als Effektor von Rac1 ist also anscheinend weit verbreitet.

3.3 Rac1 reguliert filamentöses Wachstum

Dimorphe Pilze sind in der Lage, verschiedene Wachstumsprogramme auszuführen. So kommt es häufig zu einem Umschalten zwischen Knospenwachstum und Filamentbildung (Sanchez-Martinez and Perez-Martin, 2001). Sehr oft ist das Umschalten der Wachstumsform mit der Pathogenität verknüpft (Orlowski, 1994). Mit Rac1 wurde in dieser Arbeit ein entscheidender Regulator des filamentösen Wachstums in *Ustilago maydis* beschrieben. Dieses Protein ist für die *b*-abhängige Filamentbildung, die für die pathogene Entwicklung unabdingbar ist, essentiell. Zudem reicht allein die Überexpression von *rac1* aus, um filamentöses Wachstum zu induzieren. Die so gebildeten Filamente ähneln den *b*-abhängigen Filamenten sehr. Ein einfaches Modell für die *b*-abhängige Filamentbildung wäre daher eine Stimulierung der Expression von *rac1* durch das aktive *b*-Heterodimer. Dieser Anstieg der *rac1*-Expression konnte aber in Microarray-Analysen nicht bestätigt werden. Als Reaktion auf die Expression eines aktiven *b*-Heterodimers steigt die Expression von *rac1* nur schwach an (Jörg Kämper, persönliche Mitteilung). Als andere mögliche Erklärung bleibt deshalb, dass durch das *b*-Heterodimer direkt oder indirekt die Aktivität eines Rac1-GEFs stimuliert wird. Dieser rekrutiert dann Rac1, das die Filamentbildung organisiert.

Die Tatsache, dass die Überexpression von *rac1* alleine zur Filamentbildung führt, lässt ein von Rac1 abhängiges Zellwandwachstum vermuten. Dies lässt sich in folgendem Modell zusammenfassen (Abb. 3-1): Während des normalen Knospenwachstums wird das Spitzenwachstum durch einen Rac1-GEF reguliert, der sich an der Spitze der wachsenden Knospe befindet (Abb. 3-1a). Dieser aktiviert lokal Rac1. Das aktivierte Rac1 rekrutiert dann Cla4, das lokal das Zellwandwachstum organisiert, sodass die Zelle an der Spitze wächst. Ein guter Kandidat für diesen Rac1-GEF ist das Cdc24-Homolog von *U. maydis* (Accession number EAK83460). Interessanterweise führt die Überexpression dieses Rho/Rac-GEFs ähnlich wie die Überexpression von *rac1* zur Filamentbildung (Andrea Hlubek, unveröffentlicht).

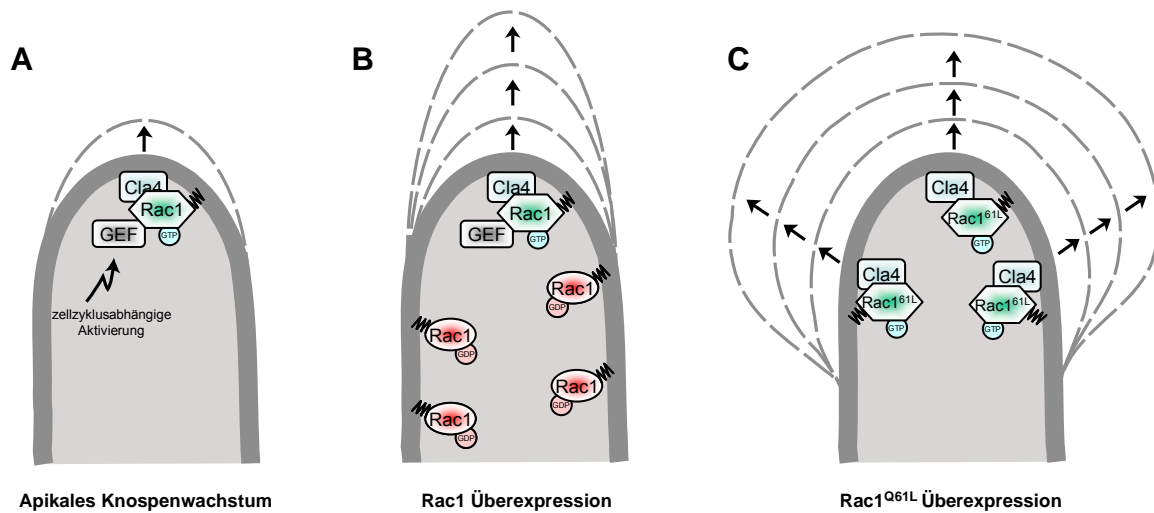


Abbildung 3-1: Modell für das Rac1-abhängige Zellwandwachstum.

A: Die Aktivierung eines an der Zellspitze postulierten Rac-GEFs führt zu einer lokalen Erhöhung der Konzentration von aktivem Rac1. Dieses rekrutiert dann Cla4, das das Zellwandwachstum einleitet. B: Durch die Überexpression von *rac1* reicht die Basalaktivität des Rac-GEFs aus, um das Rac1-abhängige Spitzenwachstum voranzutreiben. C: Die Expression von *rac1*^{Q61L} führt zu aktivem Rac1-Protein an der gesamten Zellmembran. Dies führt zu delokalisierter Aktivierung von Cla4, wodurch es zu isotropem Zellwandwachstum kommt.

Außerdem lokalisiert eine Cdc24-GFP-Fusion an der Spitze des wachsenden Filaments. Durch die Überexpression von *rac1* kommt es zu einer erhöhten Konzentration des Proteins, sodass die Basalaktivität von Cdc24 ausreichen könnte, um an der Zellspitze mehr aktives Rac1 zu aktivieren (Abb. 3-1b). Dies führt zu verstärktem Spitzenwachstum und damit zur Filamentbildung. Eine zentrale Aufgabe von Rac1 wäre also die lokale Organisation des Zellwandwachstums. Dieses Modell erklärt auch die morphologischen Umwandlungen, die durch dominant aktives Rac1^{Q61L} hervorgerufen werden (Abb. 3-1c): Hier liegt aktives Rac1 in der ganzen Zelle anstatt lokal an der Zellspitze vor. Dadurch kommt es zu isotropem Zellwandwachstum und damit zum Aufblähen der Zelle. Dass das Zellwandwachstum dabei über Cla4 verläuft, zeigt die Tatsache, dass das durch die Überexpression von *rac1*^{Q61L} hervorgerufene isotrope Wachstum in *cla4*-Deletionsmutanten supprimiert wird.

Die Rolle, die Rac1 bei der Filamentbildung von *U. maydis* spielt, steht im Einklang mit Beobachtungen bei anderen dimorphen Pilzen: So ist auch in *Yarrowia lipolytica* der Übergang zum filamentösen Wachstum abhängig von Rac1 (Hurtado et al., 2000). Auch in *Candida albicans* konnte kürzlich ein Rac-Homolog identifiziert werden (Bassilana and Arkowitz, 2006), und auch dort ist es unter bestimmten Bedingungen für das filamentöse Wachstum verantwortlich. So lässt sich verallgemeinernd festhalten, dass Rac1 eine entscheidende Rolle bei der Filamentbildung dimorpher Pilze spielt.

Interessanterweise regulieren Rac-Homologe das polare Wachstum auch im Tierreich: Rac1 ist ein entscheidender Regulator der Polarisation von Neuronen. Die Entwicklung eines Axons beginnt mit dem Auswachsen von Neuriten aus dem Zellkörper. Einer der Neuriten führt ein schnelles, polares Streckungswachstum aus und wird zum zukünftigen Axon (Dotti et al., 1988). Die anderen führen ein langsames Streckungswachstum durch und entwickeln sich zu den Dendriten der Zelle. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von dominant aktivem Rac die Verlängerung von Neuriten in *D. melanogaster* (Luo et al., 1994) und in der Maus (Leeuwen et al., 1997) fördert. Dominant negatives Rac hingegen inhibiert in beiden Organismen das Neuronenwachstum (Luo et al., 1996; Luo et al., 1994). Interessanterweise ist Rho in diesem Fall ein Gegenspieler von Rac. Die Abstimmung der Aktivitäten beider Proteine werden als entscheidend für die Regulation der Neuronenmorphologie angesehen (Kunda et al., 2001; Mackay et al., 1995).

Das Bild von Rac1 als Vermittler des polaren Wachstums wird durch die Betrachtung von Vorgängen im Pflanzenreich abgerundet: Auch hier gibt es Rac-abhängige polare Wachstumsmuster. Die Elongation der Pollenschläuche von *Arabidopsis thaliana* ist abhängig von Rac2 (Kost et al., 1999). Die Expression von dominant aktivem Rac2^{G15V} führt hier zu einem sehr ähnlichen Aufblähen des Pollens, wie es in dieser Arbeit für *U. maydis* beschrieben wurde. Auch in *A. thaliana* ist das Aufblähen von massivem delokalisierten Zellwandeinbau begleitet. Dominant negatives Rac2^{T20N} führt zu stark verkürzten Pollen, was zeigt, dass Rac2 für das polare Spitzenwachstum notwendig ist (Kost et al., 1999). Auch in der Tabakpflanze *Nicotiana tabacum* interferiert die Überexpression eines Rac-Homologs, Rac5, mit dem polaren Pollenwachstum (Klahre et al., 2006). Diese Wachstumshemmung kann allerdings durch die Expression eines RhoGDI aufgehoben werden. Außerdem ist in *N. tabacum* die korrekte Lokalisierung von Rac5 abhängig von RhoGDI. Auch diese Ergebnisse ähneln sehr der Situation in *U. maydis*: Die Überexpression von Rac1 in einem Stamm, in dem RhoGDI deletiert wurde, führt nicht zu filamentösem Wachstum (Andrea Hlubek, unveröffentlicht). Diese Ergebnisse lassen ein alternatives Modell für die Rac1-abhängige Zellpolarisierung entstehen, in dem RhoGDI eine entscheidende Rolle spielt: Möglicherweise reguliert Rac1 seine eigene Lokalisierung und Aktivierung in einer positiven Rückkopplungsschleife. Die Überexpression von Rac1 würde die Konzentration des Proteins in diesem Szenario über einen kritischen Punkt steigen lassen, ab dem ein massiver Transport von Rac1 zum Ort des polarisierten Wachstums hin stattfindet. Durch einen ähnlichen Mechanismus entsteht die spontane Polarisierung der Zelle durch aktives Cdc42p in *S. cerevisiae* (Wedlich-Söldner et al., 2003). Die punktuelle Akkumulation von aktivem

Cdc42p fördert hier den Transport von noch mehr Cdc42p an diese Stelle, wodurch sich das Konzentrationsgefälle weiter verstärkt. Die Aufrechterhaltung der Asymmetrie der Verteilung von Cdc42p in der Plasmamembran wird in einer Erweiterung des Modells dadurch erklärt, dass die kleinen G-Proteine an den Stellen, an denen kein polarisiertes Wachstum stattfindet, kontinuierlich von der Membran entfernt werden (R. Wedlich-Söldner, persönliche Mitteilung). Daran sind vermutlich RhoGDIs beteiligt. Das Fehlen dieser Proteine würde dann das Konzentrationsgefälle aufheben und das polare Wachstum inhibieren, wie es oben für *N. tabacum* und *U. maydis* beschrieben wurde.

3.4 Die Funktion von Rac1 beim Knospenwachstum

Die Deletion von *rac1* hat starke Auswirkungen auf das Knospenwachstum von haploiden Sporidien in *U. maydis*. Die Zellen sind runder und dicker. Zudem bilden sie keine normale Knospe. Stattdessen findet Wachstum an den Zellpolen statt, gefolgt von der Bildung eines zentralen Septums in der Zellmitte. Ein sehr ähnliches Wachstumsmuster zeigt die *cla4*-Deletionsmutante.

In *S. cerevisiae* wird das Knospenwachstum von Cdc42p initiiert. Das G-Protein wird hier benötigt, um den Septin-Ring zu organisieren (Jeong et al., 2001; Longtine and Bi, 2003; Pringle et al., 1995). Dieser markiert die Stelle, an der die neue Knospe gebildet werden soll. Bei Septinen handelt es sich ebenfalls um GTP-bindende Proteine. Sie sind in der Lage, Filamente auszubilden und sich zu komplexen Strukturen zusammenzulagern. In *S. cerevisiae* sind fünf verschiedene Septine als Bestandteil des Septinrings identifiziert worden. Der Septinring ist notwendig, um die Knospung zu initiieren. Während der Knospung wandelt er sich in eine uhrglasförmige Struktur um, die an der Grenze zwischen Mutter- und Tochterzelle positioniert ist. Diese Struktur spaltet sich später in zwei Ringe auf, die sich auf die Mutter- und die Tochterzelle aufteilen. (Lippincott et al., 2001). In Abwesenheit von Cdc42p kann *S. cerevisiae* die initialen Schritte zum Aufbau des Septinrings nicht ausführen und ist daher nicht in der Lage, eine Knospe zu bilden. Es konnte gezeigt werden, dass auch Cla4p an der Organisation des Septinrings beteiligt ist. Die Deletion von *cla4* führt zu fehlerhaften Septinstrukturen (Kadota et al., 2004; Longtine et al., 2000). Die Rolle, die Cdc42p bei der Septinorganisation in *S. cerevisiae* spielt, wird in *U. maydis* möglicherweise von Rac1 übernommen. Hierfür spricht, dass die Deletion von *cdc42* hier nicht mit der

Knospenbildung interferiert. Im Gegensatz dazu ist die Knospenbildung in der *rac1*-Deletionsmutante gestört. Da Cla4 in *U. maydis* ein Effektor von Rac1 ist, wäre es denkbar, dass ein Rac1-Cla4-Signalweg die entsprechende Funktion des Cdc42p-Cla4p-Signalwegs der Hefe übernimmt. In Abwesenheit von Cla4 oder Rac1 wird nach diesem Modell also der Septin-Apparat nicht gebildet und die Knospung kann nicht initiiert werden. Interessanterweise kann *U. maydis* in diesem Falle anscheinend auf einen völlig anderen Mechanismus ausweichen, um die Vermehrung zu gewährleisten: Die Zelltrennung erfolgt durch Abschnürung an einem Einzelseptum, das in der Mitte der Zelle gebildet wird. Solche zentralen Septen sind im Wildtyp bisher nur in Zellen beschrieben worden, die nach Wachstum bis in die stationäre Wachstumsphase hinein wieder in frisches Medium überführt wurden (Unrau and Holliday, 1970). In der stationären Phase befinden sich die Zellen in einem G2-Arrest. Durch Überführen in frisches Medium wird dieser aufgehoben. Die Zellen führen dann anscheinend eine Mitose aus, ohne zuvor eine Knospenbildung zu initiieren. Die beiden Kerne werden anschließend durch ein zentrales Septum voneinander getrennt. Möglicherweise wird dieses Wachstumsmuster für die Zellteilung adaptiert, wenn die normale Knospenbildung gestört ist. Für das Modell der Fehlregulation der Septine in den *rac1*- und *cla4*-Mutanten spricht der morphologische Phänotyp einer kürzlich beschriebenen Septinmutante in *U. maydis* (Boyce et al., 2005b), der auffällige Ähnlichkeiten zu dem Phänotyp von *rac1*- und *cla4*-Mutanten zeigt. Die Knospenbildung ist gestört und die Zellen teilen sich an zentralen Einzelsepten. Es wäre interessant, das Verhalten der Septine in den *rac1*- und *cla4*-Mutanten genauer zu untersuchen.

3.5 Cdc42 und Rac1 werden für die Pathogenität benötigt

In Abwesenheit von Cdc42 oder Rac1 ist *Ustilago maydis* nicht in der Lage, seinen Lebenszyklus zu vollenden. *cdc42*-Deletionsmutanten sind schon in der Paarungsreaktion blockiert. Mindestens in einem der beiden Kreuzungspartner ist die Anwesenheit eines intakten Allels von *cdc42* nötig (Mahlert, 2002). Dies stimmt überein mit der Situation in *S. cerevisiae*, wo Cdc42p ebenfalls für die Paarungsreaktion benötigt wird. Es wurde zunächst direkt in die für die Pheromonantwort zuständige Signalkaskade eingeordnet (Simon et al., 1995). Demnach aktiviert ein durch das Pheromonsignal aktiviertes heterotrimeres G-Protein Cdc42p, welches dann über Ste20p eine MAPK-Kaskade aktiviert, die über den

Transkriptionsfaktor Ste12p die Paarungsreaktion einleitet. Ob Cdc42p aber direkt an der pheromonabhängigen Signalkaskade beteiligt ist, wurde in den letzten Jahren kontrovers diskutiert. Ein alternatives Modell schlägt eine indirekte Beteiligung von Cdc42p vor (Lamson et al., 2002). In diesem Modell ist eine Interaktion von Cdc42p und Ste20p vor allem dafür nötig, diese Kinase in eine aktive Form zu versetzen. Diese ist dann in der Lage, an der Pheromonantwort teilzunehmen, die durch die Aktivierung des heterotrimeren G-Proteins ausgelöst wird, dessen Signal aber unabhängig von Cdc42p an Ste20p weitergeleitet wird. Ob in *U. maydis* Cdc42 eine direkte Rolle in der Pheromonsignalkaskade spielt, bleibt noch zu untersuchen. Allerdings deuten Konfrontationsexperimente von Wildtypstämmen mit *cdc42*-Deletionsmutanten daraufhin, dass die Expression der Pheromone in *cdc42*-Deletionsmutanten nicht gestört ist (Mahlert, 2002).

Mutanten von *rac1* in *U. maydis* zeigen im Gegensatz zu *cdc42*-Mutanten im Test auf aktivkohlehaltigen Platten eine positive Paarungsreaktion. Die Zellfusion kann hier stattfinden und es bildet sich eine weiße filzige Kolonie aus. Bei näherer Betrachtung sind die entstandenen Filamente aber deutlich kürzer und nicht in der Lage, auf dem Agar über die Grenze der Kolonie hinauszuwachsen. Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich in der Tatsache, dass Rac1 für das b-abhängige filamentöse Wachstum essentiell ist. Die im Kreuzungstest auf Aktivkohleplatten in Abwesenheit von Rac1 gebildeten kurzen Filamente sind wahrscheinlich auf den durch das b-Heterodimer induzierten Zellzyklusarrest zurückzuführen. Die arretierten Zellen wachsen an der Zellspitze weiter und bilden so in die Luft ragende Hyphen. Für eine echte Filamentbildung wäre aber die Aktivität von Rac1 nötig. Die Rolle von Rac1 im Paarungsprozess wurde auch im opportunistischen humanpathogenen Pilz *Cryptococcus neoformans* näher untersucht (Vallim et al., 2005). In *C. neoformans* werden die für die Paarungsreaktion verantwortlichen Loci MAT α und MATa genannt. MAT α -Zellen reagieren auf das MATa-Pheromon durch die Bildung von Konjugationshyphen. MATa-Zellen zeigen diese Reaktion als Antwort auf MAT α nur sehr schwach, stattdessen werden die Zellen in diesem Stamm größer (Vaughn et al., 2003). Nach abgeschlossener Zellfusion bilden sich Filamente. Es konnte gezeigt werden, dass *rac1*-Mutanten noch in der Lage sind, das Pheromon der Kreuzungspartner wahrzunehmen. Allerdings ist die Ausbildung der Konjugationshyphen in MAT α -Zellen als Antwort auf das MATa-Pheromon gestört. Dennoch können die Zellen auch hier in Abwesenheit von Rac1 fusionieren (Vallim et al., 2005). Wie in *U. maydis* ist auch in *C. neoformans* die Differenzierung der Hyphen nach der Zellfusion deutlich gestört. Im Wildtyp bilden sich nach Zellfusion filamentöse Ketten von Zellen, die durch Septen getrennt sind und fusionierte

Klammerzellen enthalten. Diese Zellen sind in Abwesenheit von Rac1 sehr viel dicker und kürzer. Außerdem sind die Klammerzellen nicht korrekt fusioniert. Dennoch kann *C. neoformans* im Gegensatz zu *U. maydis* seinen sexuellen Lebenszyklus auch in Abwesenheit von Rac1 vollenden (Vallim et al., 2005). Die Bildung der Basidien und Basidiosporen ist nicht beeinträchtigt und die Basidiosporen sind in der Lage, auszukeimen. In beiden Organismen ist Rac1 also nicht für die Zellfusion nötig, sondern reguliert nur das polare Wachstum nach der Zellfusion. Für *rac1*-Deletionsmutanten in *U. maydis* lässt sich damit auch leicht der vollständige Pathogenitätsverlust erklären: Ohne die Fähigkeit zum filamentösen Wachstum sind die Mutanten nicht in der Lage, in die Maispflanze einzudringen und sich dort zu entwickeln. Deshalb ist Rac1 in *U. maydis* im Gegensatz zu *C. neoformans*, der für die Sporenbildung nicht auf das Eindringen in einen Wirt angewiesen ist, für die Vollendung des sexuellen Lebenszyklus essentiell. Auch in *Y. lipolytica* wird Rac1 nicht für die Paarungsreaktion benötigt, spielt aber auch hier eine Rolle in der Filamentbildung (Hurtado et al., 2000). Das Protein spielt also in Pilzen keine direkte Rolle in der Paarungsreaktion. Es wird aber für das polare Wachstum der Konjugationshyphen benötigt. Außerdem ist es entscheidend für das polare Wachstum, das häufig nach der Zellfusion stattfindet.

Auch für Cdc42 wurde in dieser Arbeit eine Beteiligung an der pathogenen Entwicklung nachgewiesen, die im Lebenszyklus nach der Paarungsreaktion eine Rolle spielt. Eine *cdc42*-Deletionsmutante im solopathogenen Stamm SG200 ist vollkommen apathogen. Hier ist die Ursache allerdings nicht so offensichtlich wie im Falle von Rac1. Cdc42 wird für die b-abhängige Filamentbildung nicht benötigt. In welchem Schritt die pathogene Entwicklung in Abwesenheit von Cdc42 blockiert ist, muss noch untersucht werden. Hier ist anscheinend eine Funktion von Cdc42 entscheidend, die unabhängig von Don1 und Don3 ist, denn in Abwesenheit von diesen Proteinen ist die Pathogenität von *U. maydis* nicht eingeschränkt (Weinzierl et al., 2002).

3.6 Ras1 beeinflusst die Filamentbildung und die Septierung

Zu Beginn dieser Arbeit war für Ras1 lediglich eine Funktion in der Pheromontranskription beschrieben worden (Müller et al., 2003a). Diese Ergebnisse beruhten aber auf der Expression eines fehlerhaften Allels, das eine Sequenzinsertion trägt. In dieser Arbeit konnte aber gezeigt werden, dass Ras1 sehr wohl einen deutlichen Einfluss auf die Zellmorphologie ausübt. Die Überexpression des Proteins führt zu einer deutlichen Filamentbildung der Zellen, die der Rac1-abhängigen Filamentbildung morphologisch sehr ähnelt. Eine ähnliche Filamentbildung wird auch bei Expression von dominant aktivem Ras2 beobachtet. Möglicherweise aktivieren hier beide G-Proteine den gleichen Signalweg und es handelt sich um eine redundante Funktion. Für Ras2 wurde bereits gezeigt, dass die Filamentbildung über die MAPK-Kaskade vermittelt wird (Lee and Kronstad, 2002; Müller et al., 2003a). Ob dies auch für Ras1 zutrifft, bleibt noch zu untersuchen. Eine Regulation der Filamentbildung durch Ras1 über den cAMP-Signalweg wäre schwerer vorstellbar. Es wurden zwar filamentöse Mutanten isoliert, in denen Komponenten dieses Signalwegs betroffen waren, allerdings handelt es sich hierbei um Mutationen, die den Signalweg inaktivieren. So wächst zum Beispiel die *uac1*-Mutante filamentös (Gold et al., 1994). In *uac1*-Mutanten ist die Produktion von cAMP nicht möglich. Auch die Deletion von *adr1*, das die katalytische Untereinheit der PKA kodiert, führt zu filamentösem Wachstum (Durrenberger et al., 1998). Bei einer Regulation des filamentösen Wachstums durch Ras1 über den cAMP-Signalweg müsste man also davon ausgehen, dass die Überexpression von Ras1 die Adenylatzyklase nicht aktiviert, sondern inaktiviert. Dies würde im Gegensatz zur Situation in anderen Pilzen stehen, wo die Ras-Proteine als Aktivatoren der Adenylatzyklase beschrieben wurden (Leberer et al., 2001; Toda et al., 1985). Es ist also wahrscheinlicher, dass Ras1 das filamentöse Wachstum über die Aktivierung der MAPK-Kaskade reguliert. Um diese Hypothese zu testen, wäre eine Überexpression von *ras1* in einer *kpp4*-Deletionsmutante geeignet, in der die MAPK-Kaskade unterbrochen ist.

Ras-Proteine kontrollieren das filamentöse Wachstum in einer Vielzahl von Pilzen. So ist zum Beispiel im dimorphen pathogenen Pilz *Candida albicans* eine Deletionsmutante von Ras1 nicht mehr zum seruminduzierten filamentösen Wachstum in der Lage (Feng et al., 1999). Die Expression eines dominant aktiven Allels hingegen führt auch dort zur Filamentbildung. Die gleiche Situation findet man in *C. neoformans* (Alspaugh et al., 2000). Die Deletion resultiert in einem Defekt in der Filamentbildung, während die Expression einer dominant aktiven Version von Ras1 die Filamentbildung fördert. In all diesen Organismen wurde eine

Beteiligung von Ras an MAPK-Kaskaden und dem cAMP-Signalweg beschrieben. Die Beteiligung der Ras-Proteine an diesen Signalwegen ist also in den Pilzen hochkonserviert. Es ist allerdings auch möglich, dass Ras1 die Filamentbildung unabhängig von den beiden Signalkaskaden steuert und stattdessen eine Funktion direkt am Ort des polaren Wachstums ausübt. Hierfür spricht die Tatsache, dass das konstitutiv aktive Ras1^{Q67L} die Filamentbildung nicht auslöst. Bei Überexpression eines einfach integrierten *ras1*^{Q67L}-Allels ist nur eine sehr schwache Hyperpolarisierung der Zellen zu beobachten. Für die Filamentbildung ist also anscheinend das Durchlaufen des GTP-GDP-Zyklus der GTPase essentiell. Dies ist leichter vorstellbar, wenn man statt der Beteiligung von Ras1 an einer Signalkaskade, die über die Beeinflussung der Genexpression die Filamentbildung fördert, eine direkte Rolle von Ras1 am Ort des polaren Wachstums annimmt (Abb. 3-2). Das Durchlaufen des GTP/GDP-Zyklus wäre in diesem Modell nötig, damit Ras1 selektiv an der Zellspitze aktiviert werden kann und nur dort das polare Wachstum steuert.

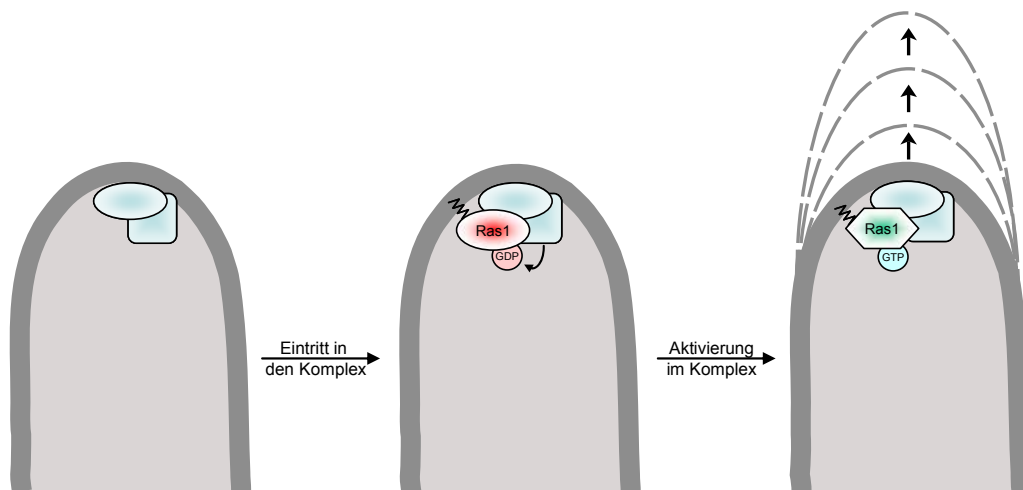


Abb. 3-2: Modell für das Ras1-abhängige Spitzenwachstum.

Am Zellpol befindet sich ein Proteinkomplex (dunkelgrün), der das Spitzenwachstum abgänglich von Ras1 steuert. In diesen Komplex tritt Ras1 in der GDP-gebundenen Form ein. Daraufhin wird ein in dem Komplex befindlicher Ras1-GEF aktiv, der das GDP gegen GTP austauscht. Dadurch wird Ras1 im Proteinkomplex aktiviert und das Spitzenwachstum beginnt.

Möglicherweise hat sogar die GDP-gebundene Form eine höhere Affinität zu dem Proteinkomplex, der das filamentöse Wachstum steuert, und wird erst im Komplex mit anderen Proteinen aktiviert. Dies würde erklären, warum das konstitutiv aktive Ras1^{Q67L} nicht ähnlich wie Rac1^{Q61L} zu massivem delokalisiertem Zellwachstum führt. Die schwache Hyperpolarisierung, die in Anwesenheit von konstitutiv aktivem Ras1^{Q67L} beobachtet wurde, könnte darauf zurückzuführen sein, dass mit geringer Effizienz auch die aktive Form in den Proteinkomplex aufgenommen werden kann.

Interessanterweise führt die Überexpression eines mehrfach integrierten *ras1*-Allels nicht zur Filamentbildung, sondern zu einer dichten Septierung der Zellen. Dieser Phänotyp ist bei Expression eines mehrfach integrierten *ras1*^{Q67L}-Allels noch stärker ausgeprägt. Außerdem lokalisiert das Protein an diesen Septen. Möglicherweise hat Ras1 eine entscheidende Rolle bei der Markierung der Septierungsstellen. Bei sehr starker Expression von Ras1 oder Ras1^{Q67L} ist anscheinend soviel Protein in der Zelle, dass es an vielen Stellen zur Organisation eines Septums kommt. Die Septenbildung interferiert dann mit dem filamentösen Wachstum, sodass es hier zu ähnlichen Phänotypen kommt. Ein sehr ähnlicher Effekt eines konstitutiven Ras-Proteins auf die Septierung wurde in *P. marneffei* beschrieben (Boyce et al., 2005a). Dieser Pilz wächst bei 25°C als septierte verzweigte Hyphe. Durch die Expression von aktivem Ras nimmt die Anzahl der Septen deutlich zu und die Abstände zwischen ihnen werden kleiner.

3.7 Ras1 induziert die Filamentbildung unabhängig von Rac1

Interessanterweise sind die Ras-Proteine in der Lage, auch in Abwesenheit von *rac1* filamentöses Wachstum zu induzieren. Allerdings sind die Filamente deutlich dicker als im Wildtyphintergrund. Dies spricht dafür, dass Rac1 zwar eine Funktion in der Morphogenese der Ras-abhängigen Filamente hat, die es wahrscheinlich über die Organisation des Aktin-Zytoskeletts ausübt, dass es aber keine direkte Rolle im Ras-abhängigen Spitzenwachstum spielt. Dies steht in starkem Kontrast zur b-abhängigen Filamentbildung, für die das Rac1-Protein essentiell ist. Anscheinend wird vom aktiven b-Heterodimer ein Signal direkt an Rac1 gesandt, das dann das polare Spitzenwachstum organisiert. Die Ras-Proteine hingegen induzieren das Wachstum an der Zellspitze unabhängig von Rac1. Möglicherweise ist hier stattdessen ein anderes Protein der Rho/Rac-Familie an der Organisation des Spitzenwachstums beteiligt oder die Ras-Proteine selber beeinflussen das Aktin-Zytoskelett an der Zellspitze.

Alternativ könnte Rac1 aber auch eine Funktion in der Aktivierung der Ras-Proteine haben. In diesem Fall würde die b-abhängige Filamentbildung über eine Signalkaskade verlaufen, die über die Aktivierung von Rac1 und einen zwischengeschalteten GEF die Ras-Proteine aktiviert. Die Filamentbildung bei Überexpression von *ras1* in Abwesenheit von *rac1* wäre dann über die Basalaktivität des GEFs zu erklären, der auch in Abwesenheit von Rac1 das im

Überfluss vorhandene Ras1-Protein aktivieren würde. Um dieses Modell zu überprüfen, müsste man *rac1* in Abwesenheit von *ras1* überexprimieren. Würde in diesem Fall die Filamentbildung ausbleiben, so wäre Ras1 tatsächlich unterhalb von Rac1 einzuordnen. Allerdings ist eine Funktion von Rac1 oberhalb von Ras-Proteinen ziemlich unwahrscheinlich, da den Proteinen der Rho/Rac-Familie bisher meist Funktionen unterhalb von Ras zugeschrieben wurden (Khosravi-Far et al., 1995; Wozniak et al., 2005). Dies gilt auch für pilzliche Organismen: In *C. trifolii* zum Beispiel supprimiert ein Rac-Homolog den temperatursensitiven Wachstumsdefekt von *ras1*-Mutanten (Vallim et al., 2005). In *C. trifolii* wurde eine direkte Interaktion zwischen Ras und Rac im Zwei-Hybrid-System nachgewiesen. Konstitutiv aktives Rac unterdrückt hier zudem die durch konstitutiv aktives Ras hervorgerufenen Defekte (Chen and Dickman, 2004) durch Aktivierung der MAPK-Kaskade. Diese wird in *C. trifolii* interessanterweise durch konstitutiv aktives Ras inaktiviert, wofür es in *U. maydis* bisher keine Anhaltspunkte gibt. In *P. marneffei* wurden interessanterweise zwischen RasA und dem Rac-Homolog CflB keine genetischen Interaktionen entdeckt. Allerdings steht RasA hier in vielen Prozessen über dem Cdc42-Homolog CflA. So führt etwa hier die Expression von konstitutiv negativem Ras zur Hyperseptierung der subapikalen Zellen während des polaren Wachstums. Zu einem ähnlichen Effekt führt die Expression eines konstitutiv aktiven CflA-Proteins. Der Effekt kann aber bei gleichzeitiger Expression von konstitutiv negativem Ras unterdrückt werden (Boyce et al., 2005a).

Die weitere Untersuchung des Zusammenspiels von Rac1 und den Ras-Proteinen während der Filamentbildung von *U. maydis* bietet eine günstige Gelegenheit, das Zusammenspiel zwischen diesen G-Proteinen besser verstehen zu lernen.

3.8 Ras1 ist essentiell für das polare Wachstum

Das Ausschalten der Expression von *ras1* in der konditionalen Mutante führt zu einem komplett apolaren Wachstumsmuster. Die Zellen werden kugelförmig und deutlich größer. Dies zeigt, dass Ras1 eine entscheidende Funktion in der Organisation der Zellmorphologie ausübt. Interessanterweise ähnelt der morphologische Phänotyp von der konditionalen *ras1*-Mutante unter reprimierenden Bedingungen stark dem von *ras2*-Deletionsmutanten (Lee and Kronstad, 2002). Auch diese wachsen häufig kugelförmig. Allerdings sind in der Studie teilweise auch

Zellen zu sehen, die länglicher sind. Dies könnte auf supprimierende extragenische Mutationen zurückzuführen sein, die im Deletionsstamm aufgetreten sind. Solch ein Ereignis wurde im Zuge dieser Arbeit auch für den konditionalen *ras1*-Stamm beobachtet, nachdem er für längere Zeit unter reprimierenden Bedingungen gehalten wurde (nicht gezeigt). Auch hier kam es zu einer Suppression, die in verlängerten Zellen resultierte, die auch deutlich besser wuchsen als die ursprüngliche Mutante. Die Zellen verhielten sich dann morphologisch eher wie *rac1*-Deletionsmutanten. Solch eine Suppression einer *ras1*- oder *ras2*-Mutante ist leicht vorstellbar durch die Anwesenheit des jeweils anderen Ras-Proteins. Möglicherweise wird in diesem Fall dessen Expression hochreguliert, sodass es teilweise den Verlust des anderen G-Proteins ersetzen kann. Ob solche redundanten Funktionen dieser beiden Proteine tatsächlich existieren, bleibt noch zu untersuchen.

In *S. cerevisiae* wurde eine solche funktionelle Redundanz bereits beschrieben. Der in *ras2*-Mutanten beobachtete temperaturabhängige Aktinpolaritätsdefekt kann hier durch stärkere Expression von *ras1* supprimiert werden (Ho and Bretscher, 2001). Außerdem sind die einzelnen Deletionen beider *ras*-Gene hier nicht letal, während eine gleichzeitige Deletion beider *ras*-Gene zum Zellzyklusarrest führt (Tatchell et al., 1984). Ein weiterer Hinweis auf funktionelle Redundanz ist die Tatsache, dass Überexpression von *ras1* komplett das gestörte Wachstum von *ras2*-Deletionsmutanten auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen supprimiert (Tatchell et al., 1985).

Dass die Ras-Proteine Effekte auf die Zellpolarität ausüben, wurde auch in anderen Organismen gezeigt. So führt in *S. pombe* die Deletion von *ras1*, dem einzigen Ras-Homolog in diesem Pilz, zu einer abnormen Zellmorphologie und Defekten im polaren Wachstum (Chang et al., 1994). Auch in *C. neoformans* hat Ras1 Auswirkungen auf das Aktinzytoskelett und damit die Zellmorphologie (Waugh et al., 2002). Deletionsmutanten zeigen hier bei erhöhten Temperaturen einen Wachstumsdefekt und völlig apolare Zellmorphologien. Auch hier kann die Expression des anderen Ras-Proteins, Ras2, den Phänotyp supprimieren.

3.9 Die Kernverteilung ist abhängig von Ras1

Die konditionale *ras1*-Mutante zeigt unter reprimierenden Bedingungen einen starken Defekt in der Kernverteilung zwischen Mutter- und Tochterzelle. So kommen Zellen vor, die überhaupt keinen Kern enthalten, aber auch Zellen, die bis zu vier Kerne enthalten. Diese sind in der Zelle sehr unregelmäßig angeordnet. Eine mögliche Erklärung für das Phänomen ist eine Fehlorganisation der mitotischen Spindel in Abwesenheit von Ras1. In *S. pombe* existiert ein Ras-abhängiger Signalweg, der Auswirkungen auf die Spindelorganisation hat (Li et al., 2000): Ras1p aktiviert hier Scd1p, einen mutmaßlichen GEF für Cdc42p. Es konnte gezeigt werden, dass Scd1p an der Spindel lokalisiert. Scd1p ist notwendig für die korrekte Lokalisation von Moe1p im Zellkern. Moe1p ist an der Organisation von Mikrotubuli beteiligt und hier für die Organisation der Spindel notwendig (Chen et al., 1999). Interessanterweise ist außer in *S. pombe* bisher in keinem anderen pilzlichen Organismus ein Effekt von Ras-Proteinen auf die Kernverteilung beschrieben worden. In Säugetieren hat Ras jedoch einen Effekt auf die Kernverteilung. Beispielsweise resultiert die Expression des Onkoproteins Hbx aus dem Hepatitis B-Virus in Chang-Zellen in einem vielkernigen Phänotyp (Yun et al., 2004). Die Kerne enthalten hier eine erhöhte Anzahl von Centrosomen und multipolare Spindeln. Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Ras-abhängigen MAPK-Kaskade durch die Expression von konstitutiv negativem Ras oder konstitutiv inaktiver MEK2 diesen Phänotyp signifikant reduziert (Yun et al., 2004). Die Aktivierung dieses Signalwegs hat also deutliche Auswirkungen auf die Organisation der Kernteilung.

3.10 Die Ras-abhängigen Signalwege in *U. maydis*

Die bisherige Modellvorstellung ging davon aus, dass die beiden Ras-Proteine in *U. maydis* zwei unterschiedliche Signalwege aktivieren. Ras1 stand demnach über dem cAMP-Signalweg, während Ras2 die MAPK-Kaskade aktivieren sollte. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten jedoch darauf hin, dass hier ein deutlich komplexeres Netzwerk vorliegt. Viele der Beobachtungen sprechen gegen eine reine Aktivierung des cAMP-Signalweges durch Ras1. Hier ist zunächst die Filamentbildung durch Überexpression von Ras1 zu nennen. Ein aktiver cAMP-Signalweg wirkt dem filamentösen Wachstum normalerweise entgegen. Ras1 aktiviert

hier also einen anderen Effektor, der die Filamentbildung fördert, möglicherweise die MAPK-Kaskade. Auch die starke Induktion der Pheromonantwort durch die Überexpression von *ras1^{Q67L}* verläuft nicht über die Aktivierung des cAMP-Signalweges, sondern über die MAPK-Kaskade: In Abwesenheit der MAPKK-Kinase Kpp4 fällt diese Antwort aus (nicht gezeigt). Zusätzlich wird unter diesen Bedingungen die Transkription von *frb34* unterdrückt, was für eine starke Aktivität der MAPK-Kaskade spricht. Es sind also beide Ras-Proteine in der Lage, die MAPK-Kaskade zu aktivieren. Interessanterweise konnte P. Müller in seiner Dissertation zeigen, dass Ras1 im Hefe-Zwei-Hybrid-System mit der in Kpp4 vorhandenen Ras-Assoziationsdomäne (RA) interagiert, nicht jedoch mit dem kompletten Protein (Müller, 2003). Die RA-Domänen sind als Vermittler der Interaktion mit Ras-Proteinen bekannt (Ponting and Benjamin, 1996). Auch diese Beobachtung spricht für eine Aktivierung der MAPK-Kaskade durch Ras1. Oberhalb von Kpp4 steht in dieser Kaskade das Adapter-Protein Ubc2, das ebenfalls eine RA-Domäne trägt (Mayorga and Gold, 2001). Dieses Protein stellt möglicherweise die Verbindung zwischen Ras2 und der MAPK-Kaskade dar, denn Ras2 ist im Hefe-Zwei-Hybrid-System nicht in der Lage, direkt mit Kpp4 oder dessen RA-Domäne zu interagieren (Müller, 2003). Es ist allerdings auch möglich, dass beide Ras-Proteine im Komplex mit Ubc2 und Kpp4 die MAPK-Kaskade aktivieren.

Ein Hinweis darauf, dass Ras1 aber ebenfalls den cAMP-Signalweg beeinflusst, ergibt sich aus der Tatsache, dass die starke Überexpression von *ras1^{Q67}* weder in *uac1*-Deletionsmutanten noch in *kpp4*-Deletionsmutanten zu einem morphologischen Phänotyp führt (Bauer, 2006). Die Hyperseptierung, die durch das konstitutiv aktive Allel ausgelöst wird, benötigt also die Aktivierung beider Signalwege.

Ein interessantes Phänomen ist die Tatsache, dass Ras1^{Q67L} die drastischen transkriptionellen und morphologischen Effekte nur bei Mehrfachintegration des entsprechenden Allels auslöst, obwohl auch in der einfach integrierten Form eine starke Expression des Allels nachweisbar ist. Möglicherweise liegt hier ein komplexer Regelkreis vor, in dem sich mehrere Signalwege gegenseitig positiv und negativ beeinflussen. Dadurch kann dieses Netzwerk möglicherweise bis zu einem kritischen Punkt die verstärkte Anwesenheit von aktivem Ras1 ausgleichen. Erst bei Überschreitung dieses Schwellenwerts würde das System dann in eine Richtung ausschlagen und zu deutlichen Effekten führen. So wird bei einfach integriertem *ras1^{Q67L}*-Allel beispielsweise die Balance zwischen cAMP-Signalweg und MAPK-Kaskade aufrechterhalten, sodass sich der Expressionslevel des als Reporter verwendeten Gens *frb34* nicht ändert. Bei Mehrfachintegration aber schert das System in Richtung hoher Aktivität der MAPK-Kaskade

aus. Die Expression von *frb34* wird unterdrückt, und die Expression des Pheromogens steigt extrem an.

In *U. maydis* wurde außer Uac1, Ubc2 und Kpp4 ein weiteres Protein identifiziert, dass eine RA-Domäne trägt. Es handelt sich hierbei um ein Homolog von Bud14p aus *S. cerevisiae*. Dem Protein aus *S. cerevisiae* fehlt allerdings die RA-Domäne. Es lokalisiert dort am Kortex der Knospe und ist für die korrekte Lokalisierung von Glc7p verantwortlich, der katalytischen Untereinheit der Proteinphosphatase 1 (Knaus et al., 2005). Zusammen mit Glc7p reguliert es hier die Stabilität der astralen Mikrotubuli und nimmt darüber Einfluss auf die Positionierung der mitotischen Spindel. Eine Deletion führt zu verstärkter Pheromonantwort, verstärktem filamentösem Wachstum und zu einem Defekt der Spindellokalisierung (Cullen and Sprague, 2002). In *U. maydis* konnten diese Effekte nicht gezeigt werden (Bauer, 2006). In Deletionsmutanten wurde lediglich ein Defekt in der morphologischen Entwicklung der Zelle und in der Septierung nachgewiesen. Interessanterweise aber hat in *bud14*-Deletionsmutanten weder die Expression von *ras1*^{Q67L} noch von *ras2*^{Q65L} einen morphologischen Effekt (Bauer, 2006). Dies spricht dafür, dass Bud14 in *U. maydis* ein Effektor von Ras1 und von Ras2 ist.

Damit ergibt sich ein Modell, in dem die Signale von Ras1 über den cAMP-Signalweg, die MAPK-Kaskade und Bud14 verarbeitet werden, während Ras2 ausschließlich oberhalb der MAPK-Kaskade und von Bud14 einzuordnen ist (Abb. 3-3). Ras1 und Ras2 sind beide in der Lage, über die MAPK-Kaskade filamentöses Wachstum zu induzieren. Der Eintritt in die MAPK-Kaskade ist möglicherweise bei beiden Proteinen unterschiedlich: Während Ras1 in der Lage ist, direkt mit Kpp4 zu interagieren, benötigt Ras2 das Adapterprotein Ubc2 dazu. Zusätzlich ist Ras1 in der Lage, über die MAPK-Kaskade die Expression der Pheromogene zu stimulieren. Auch diese Funktion teilt Ras1 anscheinend mit Ras2: In Abwesenheit von Ras2 ist die Produktion des Pheromons deutlich vermindert, aber nicht vollkommen ausgeschaltet (Lee and Kronstad, 2002). Möglicherweise haben die beiden Ras-Proteine hier überlappende Funktionen, in Abwesenheit von Ras2 reicht die Expression von Ras1 aber nicht aus, um die Pheromonantwort zu stimulieren. Solche funktionelle Redundanz in der Pheromonantwort wurde auch in *C. neoformans* gezeigt. Die Überexpression von *ras2* supprimiert hier den Paarungsdefekt der *ras1*-Deletionsmutante vollkommen (Waugh et al., 2002). Auch in *S. cerevisiae* gibt es funktionelle Redundanz zwischen den beiden Proteinen: Zum Beispiel supprimiert hier die Überexpression von *ras1* die Defekte im invasiven Wachstum der *ras2*-Mutante (Mösch et al., 1999).

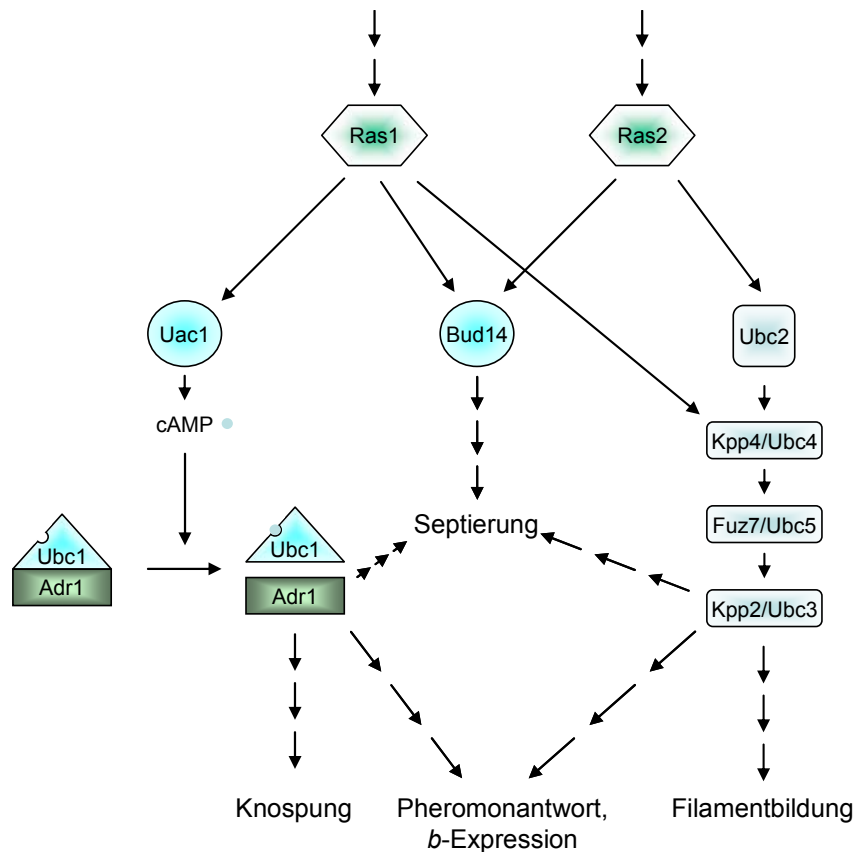


Abb. 3-3: Ras-abhängige Signalwege in *U. maydis*.

Ras1 aktiviert über die Adenylatzyklase den cAMP-Signalweg und über Kpp4 die MAPK-Kaskade, während Ras2 die MAPK-Kaskade über die Vermittlung von Ubc2 aktiviert. Außerdem interagieren beide Proteine mit dem Bud14-Homolog von *U. maydis*. Für die von *ras1*^{Q67L} ausgelöste Hyperseptierung ist die Anwesenheit aller drei Effektoren von Ras1 essentiell.

Ras1 spielt in *U. maydis* außerdem eine Rolle in der Regulation der Septierung. Die Überexpression von *ras1*^{Q67L} führt zu starker Hyperseptierung. Diese wird aber in *uac1*-, *bud14*- und *kpp4*-Deletionsmutanten unterdrückt (Bauer, 2006). Hier spielen also alle drei *ras1*-Effektoren eine Rolle. Die in Abbildung 3-3 zusammengefassten Funktionen der Ras-abhängigen Signalwege zeigen, dass das Zusammenspiel zwischen den beiden Ras-Proteinen sehr eng und komplex ist. Die beiden Proteine greifen auf ähnliche Weise in die Zellmorphologie ein und haben viele überlappende Funktionen. Dennoch kann in der natürlichen Situation keines der beiden G-Proteine das andere ersetzen. Beide Deletionsmutanten haben einen drastischen, aber morphologisch sehr ähnlichen Phänotyp.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von *ras2*, nicht aber von *ras1*, auf den cAMP-Spiegel in der Zelle reagiert. Dies ist insofern erstaunlich, als Ras2 als Aktivator der MAPK-Kaskade beschrieben wurde und Funktionen im cAMP-Weg bisher nicht gezeigt worden sind (Lee and Kronstad, 2002). Die Hochregulation der Expression von Ras2 als Antwort auf einen niedrigen cAMP-Spiegel ist aber gut als Rückkoppelungs-Schleife

erklärbar, wenn man für Ras2 auch Funktionen oberhalb des cAMP-Weges annimmt. Die Zelle würde in diesem Modell auf den durch den Ausfall der Adenylatzyklase hervorgerufenen niedrigen cAMP-Spiegel mit einer Stimulation der Expression von *ras2* reagieren, um den cAMP-Signalweg zu aktivieren.

Eine andere mögliche Erklärung für das Phänomen, die auch die Einordnung von Ras2 oberhalb der MAPK-Kaskade berücksichtigt, ist die Vernetzung zwischen der MAPK-Kaskade und dem cAMP-Weg (Abb. 3-4). Diese beiden Signalwege wirken antagonistisch auf die Zellmorphologie von *U. maydis*. Ein aktiver cAMP-Signalweg führt zu knospend wachsenden Zellen (Gold et al., 1994), während die Abwesenheit von cAMP in filamentösem Wachstum resultiert (Dürrenberger and Kronstad, 1999). Umgekehrt führt die aktive MAPK-Kaskade zur Filamentbildung (Dürrenberger and Kronstad, 1999), während das Unterbrechen dieser Kaskade filamentöses Wachstum unterdrückt. Bisher ist es noch unverstanden, durch welche Prozesse ein niedriger cAMP-Spiegel zur Filamentbildung führt, allerdings konnte gezeigt werden, dass diese Filamentbildung durch Mutationen in der MAPK-Kaskade unterdrückt werden kann. Die Filamentbildung wird also von der MAPK-Kaskade gesteuert. Ras2 wurde als Aktivator der MAPK-Kaskade beschrieben, der zu filamentösem Wachstum beiträgt.

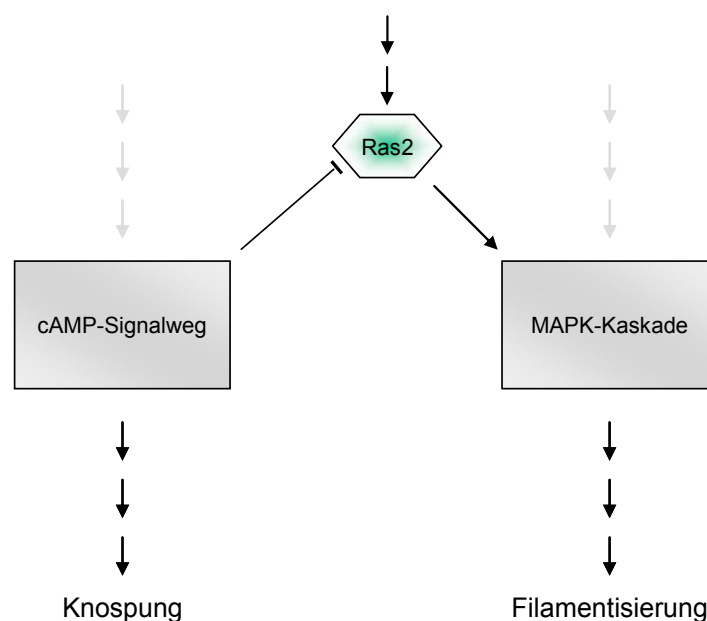


Abb. 3-4: Modell zur Vernetzung der antagonistisch wirkenden Signalwege.

Der cAMP-Signalweg und die MAPK-Kaskade steuern antagonistisch die Zellmorphologie von *U. maydis*. Ein aktiver cAMP-Signalweg führt zu Knospenwachstum und gleichzeitig zu unterdrückter Filamentbildung, die aktive MAPK-Kaskade führt zu gegenteiligen Effekten. Die bisher fehlende Verknüpfung zwischen den beiden Kaskaden könnte in der Regulation der *ras2*-Expression durch den cAMP-Signalweg zu finden sein. Demnach verringert die aktive cAMP-Signalkaskade die Aktivität von Ras2 und wirkt so inhibierend auf die MAPK-Kaskade. Beim Ausfall des cAMP-Signalwegs steigt die Expression von Ras2 an und die MAPK-Kaskade wird aktiviert.

Daher bietet die beobachtete erhöhte Expression von *ras2* als Antwort auf den Ausfall des cAMP-Signalwegs eine Erklärungsmöglichkeit für die unter diesen Umständen beobachtete Filamentbildung. Der erhöhte Level von Ras2 könnte dazu beitragen, die MAPK-Kaskade zu stimulieren und so die Filamentbildung einzuleiten. Um das Zusammenspiel der beiden Ras-Proteine in *U. maydis* besser zu verstehen, wäre es angebracht, zu untersuchen, ob die Überexpression eines Ras-Proteins ausreicht, um den Defekt des anderen Proteins zu supprimieren, wie dies in *S. cerevisiae* der Fall ist. Dies würde die überlappenden Funktionen der beiden Proteine deutlich unterstreichen. Allerdings muss in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen werden, dass in Bezug auf die Ras-Proteine ein deutlicher Unterschied zwischen *U. maydis* und *S. cerevisiae* besteht: Die beiden Ras-Proteine von *S. cerevisiae* ähneln beide viel mehr dem Ras1-Protein als dem Ras2-Protein von *U. maydis*. Dies trifft für weite Teile des N-Terminus zu, wird aber direkt am C-Terminus besonders deutlich: Der C-Terminus von Ras1p und Ras2p aus *S. cerevisiae* besitzt vor der für Farnesylierung nötigen CAAX-Box ein für Palmitoylierung benötigtes Cystein. Der gleiche Fall findet sich bei Ras1 aus *U. maydis*. Damit ähneln diese drei Proteine den humanen H-Ras und N-Ras Proteinen. Für diese Proteine wurde eine Lokalisierung sowohl an der Plasmamembran als auch an Endomembranen beschrieben. Ras2 aus *U. maydis* besitzt hingegen vor der CAAX-Box eine polybasische Region, die aus einer Häufung von Lysinen besteht. Diese Eigenschaft teilt Ras2 aus *U. maydis* mit dem humanen K-Ras. Das humane K-Ras lokalisiert ausschließlich an der Plasmamembran (Choy et al., 1999; Hancock, 2003). Während es in *S. cerevisiae* also nur einen Ras-Typ gibt, hat *U. maydis* zwei verschiedene Arten von Ras-Proteinen. Dies kommt der humanen Situation deutlich näher und macht den Pilz zu einem interessanten Modellorganismus, um die Funktionen der beiden unterschiedlichen Ras-Typen zu studieren. Die beiden *ras*-Gene in *S. cerevisiae* sind hingegen möglicherweise durch Duplikation eines einzigen Vorläufers hervorgegangen und sind sich in ihrer Funktion viel ähnlicher als die beiden Proteine in *U. maydis*. In *S. pombe* schließlich existiert nur ein einziges *ras*-Gen. Auch das von diesem Gen kodierte Protein entspricht dem H-Ras-Typ. Damit ist *S. pombe* ein gut geeigneter Modellorganismus, um die Funktionen eines Ras-Proteins des H-Ras-Typs zu studieren. Kürzlich ist es hier gelungen, zellkompartiment-spezifische Aktivitäten dieses Proteins voneinander zu trennen (Onken et al., 2006). Durch Mutation des für die Palmitoylierung notwendigen Cysteins zu Serin wurde die Lokalisierung dieses Proteins an der Plasmamembran unterdrückt, und es wurde auf die Endomembranen beschränkt. Dieses Protein ist interessanterweise noch in der Lage, über den Effektor Scd1p und Cdc42p die Zellmorphologie zu regulieren. Die Aktivierung der pheromonabhängigen MAPK-Kaskade

fällt bei diesem Protein hingegen aus. Umgekehrt kann ein ausschließlich an der Plasmamembran lokalisiertes Protein zwar die MAPK-Kaskade, aber nicht mehr Scd1p aktivieren. Ob in *U. maydis* eine derartige Aktivität an Endomembranen ebenfalls existiert, bleibt noch zu untersuchen. Das GFP-Fusionsprotein von Ras1 aber wurde hauptsächlich an der Plasmamembran gefunden, während zum Beispiel Cdc42 und Rac1 viel deutlicher an Endomembranstrukturen zu erkennen sind. Es wäre aber interessant, hier weitere Lokalisationsstudien durchzuführen, um eine ähnliche Funktion des Proteins an Endomembranen zu überprüfen. Möglicherweise ist ein so geringer Anteil des Proteins an Endomembranen lokalisiert, dass er in der GFP-Fusion nicht sichtbar wurde. Ähnliche Mutationen, wie sie von Onken et al. in *S. pombe* durchgeführt wurden, könnten aber zur Verstärkung der Lokalisation an Endomembranen führen. An menschlichem H-Ras und N-Ras konnte kürzlich ein Zyklus beschrieben werden, in dem die Lokalisierung der Proteine zwischen Exo- und Endomembranen wechselt (Rocks et al., 2005). Hier führt die Depalmitoylierung des an die Plasmamembran gebundenen Proteins zu einer Lokalisierung an inneren Membranen. Im Golgiapparat kann das Protein repalmitoyliert werden und gelangt dann wieder an die Zellmembran. Ob eine solche Dynamik in *U. maydis* ebenfalls existiert, bleibt noch zu untersuchen.

3.11 Die Funktionen der kleinen G-Proteine im Vesikelverkehr

Die in dieser Arbeit untersuchten G-Proteine sind alle an der Regulation der Vesikelfusion in *U. maydis* beteiligt. Ras1 kommt dabei eine zentrale Rolle zu, denn die Abwesenheit dieses Proteins führt zu starken Defekten in der Vakuolenfusion. Außerdem können in diesem Fall endozytotische Vesikel nicht mehr mit der Vakuole fusionieren. Interessanterweise kann aber konstitutiv aktives Rac1^{Q61L} diese Defekte supprimieren. Dies spricht dafür, dass Ras1 die Vesikelfusion über die Aktivierung von Rac1 reguliert. Ob Rac1 hier allerdings in einer Signalkaskade direkt unter Ras1 steht, oder ob die Regulation der Vakuolenfusion durch Ras1 über einen bereits bekannten Ras-abhängigen Signalweg erfolgt, bleibt nach zu klären. Im Zuge eines solchen Signalwegs könnte zum Beispiel durch eine transkriptionelle Antwort ein Cdc42/Rac1-GEF wie Cdc24 aktiviert werden, der dann die Vakuolenfusion über die Aktivierung von Rac1 fördert. Alternativ könnte Rac1 aber auch direkt ein Signal an solch einen GEF senden, um die Vakuolenfusion zu fördern.

Interessanterweise führt die Deletion von *rac1* nur zu einem geringen Defekt in der Fusion endocytotischer Vesikel mit der Vakuole. Die Fusion fällt nicht komplett aus, ist aber deutlich verlangsamt. 60 Minuten nach Anfärbung mit dem Farbstoff FM4-64 sind noch immer angefärbte endocytotische Vesikel zu erkennen, die die Vakuole noch nicht erreicht haben. In Abwesenheit von Cdc42 und Rac1 werden die Defekte in der Vesikelfunktion aber deutlich stärker: Hier ist die Fusion mit der Vakuole komplett unterbrochen und die Vakuole selber ist stark fragmentiert. Es liegt eine massive Blockade in der Vesikelfusion vor. Da in *cdc42*-Deletionsmutanten überhaupt kein Defekt im Vesikelverkehr feststellbar ist, sprechen diese Ergebnisse für redundante Funktionen der beiden Proteine in diesem Prozess. Rac1 aber organisiert die Fusion der Vesikel mit der Vakuole anscheinend effizienter, denn diese ist in der *rac1*-Deletionsmutante deutlich ineffektiver. Cdc42 kann hier die Funktion von Rac1 wohl nur bedingt übernehmen. Für diese redundante Funktion muss man aber annehmen, dass auch Cdc42 über Ras1 aktiviert wird, denn sonst würde Cdc42 den Fusionsdefekt auch in der *ras1*-Mutante supprimieren.

Für Cdc42p wurde eine Rolle in der Vakuolenfusion bereits in *S. cerevisiae* beschrieben: Es wirkt hier unterhalb der Rab-GTPase Ypt7p (Eitzen et al., 2001; Müller et al., 2001). *ypt7*-Mutanten zeigen eine sehr ähnliche Fragmentierung der Vakuole, wie sie hier für *U. maydis* beschrieben wurde (Wichmann et al., 1992). Mit Hilfe eines gegen die Region von Aminosäure 167-183 von Cdc42p gerichteten Antikörpers konnte die Vakuolenfusion *in vitro* in einer konzentrationsabhängigen Weise gehemmt werden (Müller et al., 2001). Mit diesem Ansatz gelang es zu zeigen, dass die Aktivität von Cdc42p nötig ist, nachdem die von Ypt7p vermittelte Interaktion der Membranen abgeschlossen ist. In einer parallelen Studie wurden unter Verwendung eines GDI-Proteins, das Cdc42p von der Vakuolenmembran abziehen kann, ähnliche Ergebnisse erhalten (Eitzen et al., 2001). Die Funktion, die Cdc42p während der Vakuolenfusion in *S. cerevisiae* ausübt, kann in *U. maydis* anscheinend sowohl von Rac1 als auch Cdc42 übernommen werden.

In einem genomischen Screen nach Genen, die an der homotypischen Vakuolenfusion beteiligt sind, wurde in *S. cerevisiae* auch der Cdc42-Effektor Cla4p identifiziert (Seeley et al., 2002). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Proteine, die unterhalb von Cdc42p auf die Organisation von Aktin einwirken, also Cla4p, Las17p/Bee1p (das WASP-Homolog aus *S. cerevisiae*) und der Arp2/3-Komplex, sowie Aktin selber, auf den aus *S. cerevisiae* isolierten Vakuolen vorhanden sind (Eitzen et al., 2002).

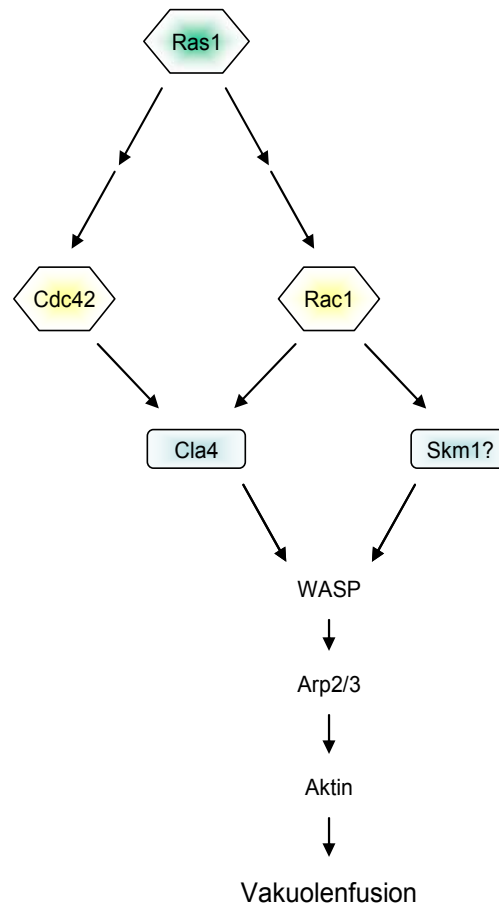


Abb. 3-5: Modell zur Regulation der Vakuolenfusion.

Die Fusion der Vakuolen wird von Rac1 und alternativ Cdc42 über die Aktivierung von Cla4 gesteuert. Ein alternativer Effektor (Skml?) kann diese Funktion in Abwesenheit von Cla4 übernehmen, kann dabei aber nur von Rac1 aktiviert werden. Auch Ras1 hat eine Rolle in der Vakuolenfusion. Ob diese Funktion über Cdc42 oder Rac1 vermittelt wird, bleibt noch zu untersuchen.

Zudem wird die Vakuolenfusion *in vitro* durch Entfernen des Aktins von den Vakuolen gestört. Dies lässt vermuten, dass Cdc42p bei der Vakuolenfusion essentielle Schritte über die Cla4p-vermittelte Organisation des Aktins ausübt. Interessanterweise konnte in *U. maydis* in dieser Arbeit in der *cla4*-Deletionsmutante keine Fragmentierung der Vakuole festgestellt werden. Allerdings läuft hier ähnlich wie in der *rac1*-Deletionsmutante die Fusion der endocytotischen Vesikel mit der Vakuole ineffizienter ab. Dies spricht für eine Beteiligung von Cla4 in diesem Prozess. Bei gleichzeitiger Abwesenheit von Cla4 und Rac1 findet man deutlich fragmentierte Vakuolen. Die Fusion der endocytotischen Vesikel an diese Vakuolen ist hier jedoch anders als in der *cdc42-rac1*-Doppelmutante nicht gestört. Dies führt zu folgendem Modell (Abb. 3-5): Cla4 ist an der Regulation der homotypischen Vakuolenfusion beteiligt. In diesem Prozess kann es von Rac1 oder Cdc42 aktiviert werden, was daraus ersichtlich ist, dass die Abwesenheit nur eines der beiden G-Proteine den Prozess nicht

unterbricht. Die Abwesenheit von Cla4 aber unterbricht den Prozess ebenfalls nicht, was dafür spricht, dass eine andere Kinase der PAK-Familie, wie Ste20 oder Skm1, die Funktion von Cla4 übernehmen kann. Da aber die gleichzeitige Abwesenheit von Cla4 und Rac1 zur Fragmentierung der Vakuole führt, muss in diesem Modell angenommen werden, dass die zweite Kinase in diesem Prozess nicht von Cdc42 aktiviert werden kann. Im Hefe-Zwei-Hybrid-System trifft das für Skm1 zu: Diese Kinase interagiert hier nur mit Rac1 (B. Sandrock, persönliche Mitteilung), was diese Kinase zu einem Kandidaten für diesen zweiten Effektor macht. Ein weiterer Hinweis darauf, dass Cla4 an der Vakuolenfusion beteiligt ist, ergibt sich aus der Beobachtung, dass dominant aktives Rac1^{Q61L} in *cla4*-Deletionsmutanten nicht zur Bildung einer großen Vakuole und zum damit verbundenen Aufblähen der Zelle führt.

Interessanterweise führen die in dieser Arbeit beschriebenen Defekte in der Vakuolenfusion zu sehr ähnlichen morphologischen Phänotypen, wie der für die *yup1_{ts}*-Mutante (vgl. Abb. 2-19) beschriebene Defekt in frühen Schritten der Endocytose (Wedlich-Söldner et al., 2000). Dies zeigt, dass ein intakter intrazellulärer Vesikelverkehr für die korrekte Ausbildung der Zellmorphologie entscheidend ist. In der *yup1_{ts}*-Mutante ist die Fusion endocytotischer Vesikel mit den frühen Endosomen aufgrund eines defekten tSNAREs unterbunden. Die veränderte Zellmorphologie wird hier auf den Zusammenbruch des Recycling-Transports von endocytierten zellwandmodifizierenden Enzymen und Zellwandkomponenten zum Ort des polaren Wachstums zurückgeführt (Wedlich-Söldner et al., 2000). Die morphologischen Defekte der konditionalen *ras1*-Mutante und der *cdc42/rac1*-Doppelmutante könnten ebenfalls auf Zusammenbruch des Vesikelverkehrs zurückzuführen sein, sodass auch hier den Transport der Wachstumskomponenten und der zellwandmodifizierenden Enzyme zum Ort des polaren Wachstums ausfällt. Allerdings ist es auch möglich, dass in Abwesenheit dieser G-Proteine Polaritätsmarker fehlen, die den Ort des polaren Wachstums kennzeichnen. Die leichte genetische Handhabbarkeit und die etablierten Methoden, mit denen der Vesikelverkehr in *U. maydis* untersucht werden kann, machen den Organismus zu einem geeigneten Modellsystem, um die regulatorischen Prinzipien und die molekularen Mechanismen des Vesikelverkehrs und dessen Auswirkungen auf die Organisation der Zellmorphologie eingehender zu untersuchen.

4 Material

4.1 Allgemeine Materialien und Bezugsquellen

4.1.1 *U. maydis*-Stämme

Tab. 4.1: Verwendete *U. maydis*-Stämme.

Stamm	Genotyp	Kernphase	Referenz
FB1	<i>a1 b1</i>	haploid	(Banuett and Herskowitz, 1989)
Bub8	<i>a2 b4</i>	haploid	Laborsammlung
Bub8 Δ <i>cdc42</i>	<i>a2 b4</i>	haploid	Laborsammlung (M. Mahlert)
FB1 Δ <i>cdc42</i>	<i>a1 b1</i>	haploid	Laborsammlung (M. Mahlert)
Bub8 Δ <i>ste20</i>	<i>a2 b4</i>	haploid	Laborsammlung (B. Sandrock)
Bub8 Δ <i>skm1</i>	<i>a2 b4</i>	haploid	Laborsammlung (B. Sandrock)
AB31	<i>a2 prg::bW2/bE1</i>	haploid	(Brachmann et al., 2001)
SG200	<i>a1::mfa2 bW2 bE1</i>	haploid	(Bölker et al., 1995)
FB1 Δ <i>kpp4</i>	<i>a1 b1</i>	haploid	(Müller et al., 2003b)
FB1 Δ <i>uac1</i>	<i>a1 b1</i>	haploid	(Gold et al., 1994)
FB1 <i>fuz7DD_{kond}</i>	<i>a1 b1</i>	haploid	(Müller et al., 2003b)
FB1 Δ <i>ubc1</i>	<i>a1 b1</i>	haploid	(Gold et al., 1994)

4.1.2 *Escherichia coli*-Stämme

Für sämtliche Klonierungen wurde der Stamm DH5 α (Hanahan, 1983) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Derivat des Stammes K12 mit folgenden genetischen Markern:

F⁻, *endA1*, *hsdR17*(*r_K⁻*, *m_K⁺*), *supE44*, *thi-1*, *gyrA96* (*Nal^r*), *relA1*, *recA1*, Δ (*argF-lacIZYA*)U169 (Φ 80*dlacZAM15*).

4.1.3 Chemikalien

Tab. 4.2: Verwendete Chemikalien.

Name	Bezugsquelle
α - ³² P-dATP	Hartmann Analytic (Braunschweig)
Acrylamid	Roth (Karlsruhe)
Agar-Agar	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Agarose medium EEO	Biomol (Hamburg)
Ammoniumnitrat	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumsulfat	Roth (Karlsruhe)
Aminobenzoessäure	Sigma (Deisenhofen)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
APS	Roth (Karlsruhe)
Bacto-Agar	Difco (Detroit)
Bromphenolblau	Roth (Karlsruhe)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)
Carboxin	Riedel-de Haen (Seelze)
Casaminoacids	Difco (Detroit)
Chloroform	Roth (Karlsruhe)
Cholinchlorid	Sigma (Deisenhofen)
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Roth (Karlsruhe)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth (Karlsruhe)
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
DNA degr. Free Acid	Sigma (Deisenhofen)
EDTA	Merck (Darmstadt)
Eisen(III)Chlorid	Roth (Karlsruhe)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethanol (vergällt)	Schmidt-GmbH (Dillenburg)
Ethanol (unvergällt)	Roth (Karlsruhe)
Ethidumbromid	Roth (Karlsruhe)
FM4-64 – Farbstoff	Molecular Probes (Leiden, NL)
Glukose	Roth (Karlsruhe)
L-Glutamin	Sigma (Deisenhofen)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
H ₂ O, für molekularbiologische Zwecke	Braun (Melsungen)
Hefeextrakt	GibcoBRL Life Technologies (Eggenstein)
HygromycinB	Duchefa (Haarlem, NL)
Myo-Inositol	Sigma (Deisenhofen)
IPTG	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Kaliumacetat	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kaliumnitrat	Roth (Karlsruhe)

Kupfersulfat	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Manganchlorid	Mallinckrodt Baker BV (Deventer, NL)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumcitrat	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
Natriumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
Natriummolybdat	Merck (Darmstadt)
Nicotinsäure	Sigma (Deisenhofen)
Nourseothricin	Werner Bioagents (Jena)
Orange G	Sigma (Deisenhofen)
Ca-Pantothenat	Sigma (Deisenhofen)
Paraffinöl	Merck (Darmstadt)
Pepton	Difco (Detroit, US)
Phenol	Roth (Karlsruhe)
Polyethylenglycol (PEG 4000)	Merck (Darmstadt)
Potato-Dextrose	Difco (Detroit, US)
Proteinase K	Sigma (Deisenhofen)
Pyridoxin	Sigma (Deisenhofen)
Riboflavin	Sigma (Deisenhofen)
Saccharose	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure	Roth (Karlsruhe)
Sequagel™ XR	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Sorbitol	Sigma (Deisenhofen)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
Thiamin	Sigma (Deisenhofen)
Tris	Roth (Karlsruhe)
TritonX-100	Sigma (Deisenhofen)
Trypton	GibcoBRL Life Technologies (Eggenstein)
X-Gal	Roth (Karlsruhe)
Zinkchlorid	Merck (Darmstadt)

4.1.4 Kits

Tab. 4.3: Verwendete Kits.

Name	Bezugsquelle
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
JETSORB'g'Kit	Genomed (Bad Oeynhausen)
Maxi-Kit Jetstar 2.0	Genomed (Bad Oeynhausen)
Megaprime Labeling Kit	Amersham (Braunschweig)
peqGOLD Plasmid Mini Prep Kit I	peqLAB (Erlangen)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
Topo TA Cloning Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega (Mannheim)

4.1.5 Enzyme und Proteine

Tab. 4.4: Verwendete Enzyme und Proteine.

Name	Bezugsquelle
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	Amersham (Braunschweig)
Lysozym	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Novozym 234	Novo Nordisc (Kopenhagen, DN)
Pfx DNA-Polymerase	Promega (Mannheim)
Restriktionsendonukleasen	Amersham (Braunschweig); New England Biolabs GmbH (Schwalbach)
RNAse A	Serva (Heidelberg)
T4-DNA-Ligase	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Taq-Polymerase	GibcoBRL Life Technologies (Eggenstein)

4.1.6 Sonstige Materialien

Tab. 4.5: Sonstige Materialien.

Material	Bezugsquelle
BIODYNE B - Membran (0,45 µm)	Pall (Dreieich)
Blottingpapier	Macherey-Nagel (Düren)
Elektroporationsküvetten	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Falcon-Röhrchen (15ml und 50 ml)	Greiner (Frickenhausen)
Faltenfilter	Schleicher und Schuell (Dassel)
Glasperlen	Sigma (Deisenhofen)
Kunststoff-Küvetten	Sarstedt (Nümbrecht)
Mais-Samen	Olds Seed Solutions (Madison, US)
MobiSpin Columns	MoBiTec (Göttingen)
Petrischalen	Greiner (Frickenhausen)
Pipettenspitzen	Greiner (Frickenhausen)
Röntgenfilm CEA RP New medical X-Ray Film	CEA AB (Strängnäs, Schweden)
Schikanekolben	Ochs (Bovenden)
sterile Spritzen und Kanülen	Braun (Melsungen)
Sterilfilter	Sarstedt (Nümbrecht)
Storage Phosphor Screen	Amersham (Freiburg)

4.1.7 Puffer und Lösungen

Falls nicht anders angegeben, sind alle Puffer und Lösungen mit H₂O bidest. angesetzt.

AE-Puffer (RNA-Präparation)	50 mM Na-Acetat, pH 5,3 10 mM Na ₂ -EDTA
Ampicillin-Lösung	10 mg/ml Ampicillin
Carboxin-Lösung	2 mg/ml Carboxin in Methanol

DNA-Auftragspuffer (10x)	0,1 % (w/v) Bromphenolblau 0,2 % (w/v) Xylencyanol FF 0,2 % (w/v) Orange G 50 % (w/v) Saccharose 1 mM Na ₂ -EDTA
dNTP-Lösung	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP
Lysis-Puffer (DNA-Präparation aus <i>U. maydis</i>)	2,0 % (w/v) Triton X-100 1 % (w/v) SDS 100 mM NaCl 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0 1 mM Na ₂ -EDTA
Lysozym-Lösung	10 mg/ml Lysozym 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0
MOPS-Puffer (10 x)	200 mM MOPS, pH 7,0 80 mM Na-Acetat 10 mM Na ₂ -EDTA
Northern-Hybridisierungspuffer	50 mM PIPES, pH 6,5 100 mM NaCl 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 1 mM EDTA 5 % (w/v) SDS
Northern-Waschpuffer	1 x SSC 5 % SDS
Northern-Strip-Puffer	0,1 x SSC 0,1 % SDS
PCR-Puffer (<i>Taq</i> DNA-Polymerase)	10 mM Tris/HCl, pH 8,3 50 mM KCl 1,5 mM MgCl ₂

Phenol/AE	50 % (v/v) Phenol 50 % (v/v) AE-Puffer
Phenol/Chloroform	50 % (v/v) Phenol 50 % (v/v) Chloroform
RNA-Auftragspuffer	50 % (w/v) Saccharose 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF in MOPS-Puffer
Salzlösung nach Holliday (sterilfiltriert)	16,0 ‰ (w/v) KH_2PO_4 4,0 ‰ (w/v) Na_2SO_4 8,0 ‰ (w/v) KCl 4,08 ‰ (w/v) MgSO_4 1,32 ‰ (w/v) CaCl_2 8,0 ‰ (v/v) Spurenelement-Lösung
SCS-Puffer (Protoplastierung)	20 mM Natriumcitrat-Puffer pH 5,8 1 M Sorbitol
SCS-Novozym-Lösung (Protoplastierung) (sterilfiltriert, frisch angesetzt)	0,5 % (w/v) Novozym 234 in SCS-Lösung
Sol A (Plasmidpräparation)	50 mM Glukose 25 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0 10 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 100 µg/ml RNase A
Sol B (Plasmidpräparation)	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS
Sol C (Plasmidpräparation)	5 M Kalium-Acetat 2 M Essigsäure
STET-Puffer	50 mM EDTA 50 mM Tris/HCl pH8 8 % (w/v) Saccharose 5 % (v/v) Triton X 100 2 M Essigsäure

Southern-Denaturierungslösung	0,25 M HCl
Southern-Transferlösung	0,4 M NaOH
Southern-Hybridisierungspuffer	7 % (w/v) SDS 500 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,0
Southern-Waschpuffer	1 % (w/v) SDS 100 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,0
Spurenelement-Lösung (sterilfiltriert)	0,06 ‰ (w/v) H ₃ BO ₃ 0,14 ‰ (w/v) MnCl 0,4 ‰ (w/v) ZnCl ₂ 0,4 ‰ (w/v) Na ₂ MoO ₄ 0,1 ‰ (w/v) FeCl ₃ 0,04 ‰ (w/v) CuSO ₄
SSC (20 x)	300 mM Na-Citrat, pH 7,0 3 M NaCl
STC-Puffer (Protoplastierung)	1 M Sorbitol 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 100 mM CaCl ₂
STC/PEG (Transformation <i>U. maydis</i>)	60 % (v/v) STC-Puffer 40 % (w/v) Polyethylenglykol
TAE-Puffer	40 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,3 20 mM Na-Acetat 2 mM Na ₂ -EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0 1 mM Na ₂ -EDTA
TE mit RNaseA	50 µg/ml RNaseA in TE-Puffer

Vitaminlösung nach Holliday	0,1 ‰ (w/v) Thiamin
	0,05 ‰ (w/v) Riboflavin
	0,05 ‰ (w/v) Pyridoxin
	0,2 ‰ (w/v) Ca-Pantothenat
	0,05 ‰ (w/v) Aminobenzoesäure
	0,2 ‰ (w/v) Nicotinsäure
	0,2 ‰ (w/v) Cholinchlorid
	1,0 ‰ (w/v) myo-Inositol
X-Gal-Lösung	2,0 % (w/v) X-Gal
	in N, N-Dimethylformamid

4.1.8 Medien zur Kultivierung von *U. maydis*

Bezeichnung	Lösung in H₂O dest.
Complete Medium (CM)	0,25 % (w/v) Casaminoacids
	0,1 % (w/v) Yeast-Extract
	1,0 % (v/v) Vitaminlösung nach Holliday
	0,05 % (w/v) DNA degr. Free Acid
	6,25 % (v/v) Salzlösung nach Holliday
	0,15 % (w/v) Ammoniumnitrat
	1,0 % (w/v) Glukose bzw. Arabinose
MM-Glutamin-Medium	4,38 g/l L-Glutamin
	1 % (w/v) Glukose bzw. Arabinose
	6,25 % (v/v) Salzlösung nach Holliday
NSY-Glycerin-Medium	8 g/l Nutrient Broth
	5 g/l Saccharose
	1 g/l Hefe-Extrakt
	69,6 % (v/v) Glycerin
PD- Agar	24 g/l Potato Dextrose Broth
	2,0 % (w/v) Agar
PD-Charcoal-Agar	24 g/l Potato Dextrose Broth
	10 g/l Charcoal
	2,0 % (w/v) Agar

Regenerations-Agar	10 g/l Hefe-Extrakt 20 g/l Pepton 2,0 % (w/v) Saccharose bzw. Glukose bzw. Arabinose 182,2 g/l Sorbitol 1,5 % (w/v) Agar
YEPA-Agar	10 g/l Hefe-Extrakt 20 g/l Pepton 2,0 % (w/v) Agar 2,0 % (w/v) Arabinose
YEPD-Agar	wie YEPA-Agar jedoch statt Arabinose 2,0 % (w/v) Glukose
YEPS-Medium	10 g/l Hefe-Extrakt 20 g/l Pepton 2,0 % (w/v) Saccharose
Wasseragar	2,0 % (w/v) Agar
YNBA-Medium	1,7 g/l Yeast Nitrogen Base 0,2 % (w/v) Ammoniumsulfat 4,0 % (v/v) Arabinose-Stammlösung (50,0 % (w/v))
YNB-G-Medium	1,7 g/l Yeast Nitrogen Base 0,2 % (w/v) Ammoniumsulfat 4,0 % (v/v) Glukose-Stammlösung (50,0 % (w/v))
YNB-Regenerations-Agar	1,7 g/l Yeast Nitrogen Base 0,2 % (w/v) Ammoniumsulfat 2,0 % (w/v) Glukose bzw. Arabinose 182,2 g/l Sorbitol 1,5 % (w/v) Agar

4.1.9 Medien zur Kultivierung von *E. coli*

Bezeichnung	Lösung in H ₂ O dest.
dYT-Medium	16 g/l Trypton 10 g/l Hefe-Extrakt 5 g/l NaCl
dYT-Agar	wie dYT-Medium 1,3 % (w/v) Agar
dYT-Glycerin-Medium	wie dYT-Medium 69,6 % (v/v) Glycerin

4.1.10 Nukleinsäuren

4.1.10.1 Plasmide

Tab. 4.6: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Name	Resistenz	Herkunft	Verwendung
P123-Nterminal-GFP	Amp, Cbx	Laborsammlung	Herstellung der GFP-Fusionen von Cdc42 und Rac1. Enthält den <i>etef</i> -Promotor gefolgt von der für GFP kodierenden Sequenz und einer MCS, die unter anderem eine MluI- und eine NotI-Schnittstelle enthält.
pBS-hhn	Amp	Jörg Kämper, persönliche Mitteilung	Gewinnung der Hygromycin-Resistenz für die Deletionsmutante
pCdc42ΔHyg	Amp	Laborsammlung (Mahlert, 2002)	Deletion von <i>cdc42</i> in den Stämmen AB31, SG200 und Bub8 <i>rac1</i> _{kond}
pCR2.1-Topo	Amp	Invitrogen (Topo TA Cloning Kit)	Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten

pCrg-GFP-Ala6-MXN	Amp, Cbx	Laborsammlung	Herstellung der GFP-Fusionen von Ras1. Enthält den <i>crg</i> -Promotor gefolgt von der für GFP kodierenden Sequenz und einer MCS, die unter anderem eine MluI- und eine NotI-Schnittstelle enthält.
pGonc-cbx-eGFP-NLS	Amp, Cbx	Gero Steinberg, Laborsammlung (Straube et al., 2001)	Lokalisierung der Kerne in den <i>rac1</i> -Deletionsmutanten mittels GFP-NLS
pMF2-1H	Amp, Hyg	Laborsammlung (Brachmann et al., 2004)	Gewinnung der Hyg-Kassette und des <i>crg</i> -Promotors als SfiI-Fragment zur Konstruktion der konditionalen <i>ras1</i> -Mutante
pNEB-UN	Amp, NAT	Laborsammlung	Gewinnung der NAT-Kassette als NotI-Fragment für die Herstellung der konditionalen <i>rac1</i> -Mutante und der <i>rac1</i> -Deletionsmutante
pRU11	Amp, Cbx	Laborsammlung	Gewinnung des <i>crg</i> -Promotors als NotI-NdeI-Fragment
pRU11ΔNotI	Amp, Cbx	Laborsammlung	Expressionsvektor für <i>U. maydis</i>
pUC18	Amp	MBI Fermentas	Klonierungsvektor
pSL1180	Amp	Amersham	Klonierungsvektor

Tab. 4.7: In dieser Arbeit konstruierte Plasmide.

Name	Resistenz	Anmerkungen
pCR2.1-TOPO-upRac1	Amp	Enthält die upstream-Sequenz von <i>rac1</i> , die durch die Primer MB536 und MB537 aus genomischer DNA von <i>U. maydis</i> amplifiziert wurde.
pCR2.1-TOPO-downRac1	Amp	Enthält die downstream-Sequenz von <i>rac1</i> , die durch die Primer MB582 und MB583 aus genomischer DNA von <i>U. maydis</i> amplifiziert wurde.
pEtef-GFP-Cdc42	Amp, Cbx	Enthält den ORF von <i>cdc42</i> , einkloniert in die MluI- und die NotI-Schnittstelle von p123-Nterminal-GFP. Der ORF wurde unter Verwendung der Primer MB130 und MB758 amplifiziert.

pEtef-GFP-Rac1	Amp, Cbx	Enthält den ORF von <i>rac1</i> , einkloniert in die MluI- und die NotI-Schnittstelle von p123-Nterminal-GFP. Der ORF wurde unter Verwendung der Primer MB508 und MB758 amplifiziert.
pRac1condNAT	Amp, NAT	Verwendet zur Herstellung der konditionalen <i>rac1</i> -Mutante. Enthält die upstream-Sequenz von <i>rac1</i> gefolgt von der NAT-Resistenzkassette, dem <i>crg</i> -Promotor und dem <i>rac1</i> -ORF mit anschließender downstream-Sequenz. Die upstream-Sequenz von <i>rac1</i> aus pCR2.1-TOPO-upRac1 wurde in die AflII- und XhoI-Schnittstellen von pSL1180 einkloniert. In die NotI-Schnittstelle dieses Vektors wurde die NAT-Resistenzkassette aus pNEB-UN einkloniert. Der <i>crg</i> -Promotor wurde als NdeI-NotI-Fragment aus pRU11 in die NdeI- und NotI-Schnittstellen des Vektors einkloniert. Der <i>rac1</i> -ORF und die anschließende 3'-Sequenz wurden mit MB479 und MB487 aus genomischer DNA von <i>U. maydis</i> amplifiziert und in die NdeI- und HpaI-Schnittstellen einkloniert. Der komplette Vektor wurde mit AflII und PsiI geschnitten und das erhaltene 9897 bp-Fragment wurde in <i>U. maydis</i> eingebracht.
pRac1ΔNAT	Amp, NAT	Die upstream-Sequenz von <i>rac1</i> aus pCR2.1-TOPO-upRac1 wurde in die AflII- und XhoI-Schnittstellen, und die downstream-Sequenz aus pCR2.1-TOPO-downRac1 in die EcoRV- und NdeI-Schnittstellen von pSL1180 kloniert. Außerdem enthält der Vektor die NAT-Kassette aus pNEB-UN in der NotI-Schnittstelle. Durch Restriktion mittels AlwNI und HindIII ergibt sich ein Fragment von 6675 bp, das zur Deletion von <i>rac1</i> in <i>U. maydis</i> transformiert wurde.

pRas1condHyg	Amp, Hyg	Verwendet zur Herstellung der konditionalen <i>ras1</i> -Mutante. Enthält die upstream-Sequenz von <i>ras1</i> gefolgt von der Hyg-Kassette, dem <i>crg</i> -Promotor und dem <i>ras1</i> -ORF mit anschließender downstream-Sequenz. Die upstream-Sequenz von <i>ras1</i> wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer MC756 und MC757 amplifiziert. Dabei wurden eine KpnI- und eine SfiI-Schnittstelle in das Fragment eingeführt. Das Fragment, das den ORF enthält, wurde unter Verwendung der Primer MC758 und MC759 amplifiziert, wobei eine SfiI- und eine KpnI-Schnittstelle eingeführt wurde. Die beiden Fragmente wurden zusammen mit einem SfiI-Fragment aus pMF2-1h, das die Hyg-Kassette und den <i>crg</i> -Promotor enthält, in pUC18, der mit KpnI geöffnet wurde, inkloniert. Der so entstandene Vektor wurde mit KpnI geschnitten, um ein 6425 bp großes Fragment zu erhalten, das in <i>U. maydis</i> eingebracht wurde.
pRU2ΔNotI-Rac1^{Q61L}	Amp, Cbx	Enthält den ORF von Rac1 ^{Q61L} , der in die NdeI- und NotI-Schnittstelle von pRU2ΔNotI inkloniert wurde. Verwendet zur regulierbaren Expression von <i>rac1</i> ^{Q61L} in <i>U. maydis</i> unter Kontrolle des <i>nar</i> -Promotors. Vor dem Einbringen mit SspI linearisiert.
pRU11ΔNotI-Rac1	Amp, Cbx	Enthält den ORF von Rac1, der durch die Primer MB479 und MB508 aus genomischer DNA von <i>U. maydis</i> amplifiziert und in die NdeI- und NotI-Schnittstelle von pRU11ΔNotI inkloniert wurde. Verwendet zur regulierbaren Expression von <i>rac1</i> in <i>U. maydis</i> . Vor dem Einbringen mit SspI linearisiert.
pRU11ΔNotI-Rac1^{Q61L}	Amp, Cbx	Enthält den ORF von Rac1 ^{Q61L} , der in die NdeI- und NotI-Schnittstelle von pRU11ΔNotI inkloniert wurde. Verwendet zur regulierbaren Expression von <i>rac1</i> ^{Q61L} in <i>U. maydis</i> unter Kontrolle des <i>crg</i> -Promotors. Vor dem Einbringen mit SspI linearisiert.
pRU11ΔNotI-Rac1^{T35A/Q61L}	Amp, Cbx	Enthält den ORF von Rac1 ^{T35A/Q61L} , der in die NdeI- und NotI-Schnittstelle von pRU11ΔNotI inkloniert wurde. Verwendet zur regulierbaren Expression von <i>rac1</i> ^{T35A/Q61L} in <i>U. maydis</i> . Vor dem Einbringen mit SspI linearisiert.

pRU11ΔNotI-Ras1	Amp, Cbx	Enthält den ORF von Ras1, der in die NdeI- und NotI-Schnittstelle von pRU11ΔNotI einkloniert wurde. Verwendet zur regulierbaren Expression von <i>ras1</i> in <i>U. maydis</i> . Vor dem Einbringen mit SspI linearisiert.
pRU11ΔNotI-Ras1^{Q67L}	Amp, Cbx	Enthält den ORF von Ras1 ^{Q67L} , der in die NdeI- und NotI-Schnittstelle von pRU11ΔNotI einkloniert wurde. Verwendet zur regulierbaren Expression von <i>ras1</i> ^{Q67L} in <i>U. maydis</i> . Vor dem Einbringen mit SspI linearisiert.

4.1.10.2 λ-DNA

Als Mengen- und Größen-Standard für die DNA-Gelelektrophorese diente λ-DNA von der Fa. MBI Fermentas. Für die Verwendung als Mengenstandard wurde diese auf 10 µg/µl verdünnt. Die durch Inkubation mit dem Restriktionsenzym *PstI* entstehenden Fragmente für den Größenstandard wiesen folgende Längen in Basenpaaren (bp) auf: 14057, 11506, 5077, 4749, 4507, 2838, 2556, 2459, 2443, 2140, 1986, 1700, 1159, 1093, 805, 514, 468, 448, 339, 264, 247, 216, 211, 200, 164, 150, 94, 87, 72, 15.

4.1.10.3 Oligonukleotid-Primer

Tab. 4.8: Liste der Primer.

Primer-Nummer	Funktion	Sequenz
MB479	Gewinnung des <i>racI</i> -ORFs, Einbringen einer NdeI-Schnittstelle am 5'-Ende.	CGC ACA TAT GCA GAC CAT CCA AGT GT
MB487	Amplifikation des <i>racI</i> -ORFs und der anschließenden downstream-Sequenz für die Konstruktion der konditionalen <i>racI</i> -Mutante. Einbringen einer HpaI-Schnittstelle.	GAC GCG TTA ACG ACG GAT AAC GCC AAC
MB506	Einbringen der Q61L-Mutation in den ORF von <i>racI</i> . Enthält eine XhoI-Schnittstelle als Marker für die Mutation. Reverse-Primer, zusammen mit MB479 in der PCR eingesetzt, um den ersten Teil des mutierten Allels zu erhalten.	CGT AGT CCT CGA GAC CCG CAG TAT C
MB507	Einbringen der Q61L-Mutation in den ORF von <i>racI</i> . Enthält eine XhoI-Schnittstelle als Marker für die Mutation. Forward-Primer, zusammen mit MB508 in der PCR eingesetzt, um den zweiten Teil des Allels zu erhalten.	GGG ATA CTG CGG GTC TCG AGG ACT ACG
MB508	Gewinnung des <i>racI</i> -ORFs, Einbringen einer NotI-Schnittstelle am 3'-Ende	TGT TCG GCG GCC GCT CTT AAA GAA TCA TAC A
MB536	Gewinnung der upstream-Sequenz von <i>racI</i> , Einbringen einer AflII-Schnittstelle	CTT AAG AGC TAT GAC CAT GAT TAC
MB537	Gewinnung der upstream-Sequenz von <i>racI</i> , Einbringen einer XhoI-Schnittstelle	GAT CGT CTC GAG GAT TGC GAG
MB549	Einbringen der T35A-Mutation in den ORF von <i>racI</i> ^{Q61L} . Reverse-Primer, zusammen mit MB479 in der PCR eingesetzt, um den ersten Teil des Allels zu erhalten.	TGT CAA ACA CTG CAG GGA TGT ATT C
MB550	Einbringen der T35A-Mutation in den ORF von <i>racI</i> ^{Q61L} . Forward-Primer, zusammen mit MB508 in der PCR eingesetzt, um den zweiten Teil des Allels zu erhalten.	GAA TAC ATC CCT GCA GTG TTT GAC A
MB582	Gewinnung der downstream-Sequenz von <i>racI</i> , Einbringen einer NdeI-Schnittstelle	CAT ATG GTT TCG TGG TTC GTT GGC
MB583	Gewinnung der downstream-Sequenz von <i>racI</i> , Einbringen einer BamHI-Schnittstelle	AGGATCCGCCGACGTCGCACGCA
MB758	Einfuhr einer MluI-Schnittstelle in den 5'-Bereich des ORFs von <i>cdc42</i> und <i>racI</i> zur Herstellung der GFP-Fusionen	CAC GCG TGA TGC AGA CCA TCA AGT GTG TC
MB766	PCR-Kontrolle der korrekten Integration in den <i>cbx</i> -Locus (Hlubek, 2004)	GAG CAG TTC ATG ATG GTA AG

MB767	PCR-Kontrolle der korrekten Integration in den <i>cbx</i> -Locus (Hlubek, 2004)	TTC GAG CTG GTT GCC TGC
MB768	PCR-Kontrolle der korrekten Integration in den <i>cbx</i> -Locus (Hlubek, 2004)	CTA TGC GGC ATC AGA GCA G
MB769	PCR-Kontrolle der korrekten Integration in den <i>cbx</i> -Locus (Hlubek, 2004)	GAG CAG TTC ATG ATG GTG TG
MC723	M13 reverse-Primer zur Sequenzierung	CAG GAA ACA GCT ATG AC
MC724	M13 forward-Primer zur Sequenzierung	GTA AAA CGA CGG CCA G
MC756	Gewinnung der upstream-Sequenz von <i>ras1</i> , Einbringen einer KpnI-Schnittstelle	CGC TGG TAC CGA GAC TGT AAC CTC TGG GAA AGA
MC757	Gewinnung der upstream-Sequenz von <i>ras1</i> , Einbringen einer SfiI-Schnittstelle	CGG TGG CCA TCT AGG CCT GCA ATT CAC GTA AGC GTA CCT ATG
MC758	Gewinnung des <i>ras1</i> -ORF und angrenzender downstream-Sequenz, Einbringen einer SfiI-Schnittstelle	GAT AGG CCT GAG TGG CCA TGT CCA AAG CAC AAT TCT TGC G
MC759	Gewinnung des <i>ras1</i> -ORF und angrenzender downstream-Sequenz, Einbringen einer KpnI-Schnittstelle	CAG AGG TAC CAC GAG CTA GAC AAG TTC ACG
MC891	Einbringen der Q67L-Mutation in den ORF von <i>ras1</i> . Enthält eine XhoI-Schnittstelle als Marker für die Mutation. Forward-Primer, zusammen mit MC894 in der PCR eingesetzt, um den zweiten Teil des Allels zu erhalten.	GAT ACA GCT GGT CTC GAG GAA TAC
MC892	Einbringen der Q67L-Mutation in den ORF von <i>ras1</i> . Enthält eine XhoI-Schnittstelle als Marker für die Mutation. Reverse-Primer, zusammen mit MC893 in der PCR eingesetzt, um den ersten Teil des Allels zu erhalten.	GTA TTC CTC GAG ACC AGC TGT ATC
MC893	Gewinnung des <i>ras1</i> -ORF, Einbringen einer NdeI-Schnittstelle	GAA TTC ATA TGT CCA AAG CAC AAT TCT TGC GAG
MC894	Gewinnung des <i>ras1</i> -ORF, Einbringen einer NotI-Schnittstelle	CGG ATG CGG CGG CTT AGA GAA CGA TAC ATT TCT GGC
MC947	Gewinnung des <i>ras1</i> -ORF, Einbringen einer MluI-Schnittstelle zur Herstellung der GFP-Fusion	GTG CAC GCG TGA TGT CCA AAG CAC AAT TCT TG
MC995	Sequenzierprimer für pRU11ΔNotI, upstream von NdeI	CAG AAC GAT GCA GTC TGG AGG CTC
MC996	Sequenzierprimer für pRU11ΔNotI, downstream von NotI	GAT AAT CAT CGC AAG ACC GGC AAC

5 Methoden

5.1 Anzucht von Mikroorganismen

5.1.1 Anzucht von *Escherichia coli*

Flüssigkulturen von *E. coli* wurden in autoklaviertem dYT-Medium unter aeroben Bedingungen angezogen. Dem Medium wurde, wenn nötig, Ampicillin mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt.

Zur Kultivierung auf Festmedium wurde dYT-Agar verwendet, wenn nötig mit oben genannter Konzentration an Ampicillin. Zum Nachweis von β -Galaktosidase-Aktivität im Blau-Weiß-Test wurde X-Gal mit einer Endkonzentration von 0,02 % (w/v) zugegeben.

Bei der Anzuchttemperatur wurde für Über-Nacht-Kulturen (ÜNKs) 37°C gewählt.

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden ÜNKs mit dYT-Glycerin-Medium in Verhältnis 1:1 gemischt und bei -80°C eingefroren.

5.1.2 Anzucht von *U. maydis*

Flüssigkulturen von *U. maydis* wurden meist auf YEPS-Medium angezogen, wobei auf gute Durchlüftung des Medium geachtet wurde, um aerobe Bedingungen zu gewährleisten. Wenn nötig, wurde Hygromycin (200 µg/ml Endkonzentration), Carboxin (2 µg/ml Endkonzentration) oder Nourseothricin (150 µg/ml Endkonzentration) zugesetzt. Die Zugabe der sterilfiltrierten Antibiotika (ABs) erfolgte nach dem Autoklavieren. Die Induktion des *crg*-Promotors erfolgte meist auf YNB-A-Medium. In einigen Fällen wurde auch CM-Medium mit 1 % (w/v) Glukose oder Arabinose verwendet. Die Anzucht der Kulturen erfolgte über Nacht oder bis zu mehreren Tagen bei 28°C.

Die Kultivierung auf Festmedium geschah auf YNB-G-Agar, YNB-A-Agar, PD-Agar, YNB-Regenerationsagar oder Regenerationsagar, falls erforderlich mit oben genannten AB-Konzentrationen.

Für Dauerkulturen wurden ÜNKs mit NSY-Glycerin-Medium im Verhältnis 1:1 gemischt und bei -80°C gelagert.

5.2 DNA-Präparationen

5.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* - analytischer Maßstab

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde nach der Methode der Alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979) oder alternativ der Kochenden Lyse durchgeführt. In einigen Fällen wurde auch das peqGOLD Plasmid Mini Prep Kit I nach Herstellerangaben verwendet.

Alkalische Lyse

Es wurden 1,5 ml ÜNK in einem Reaktionsgefäß abzentrifugiert (1 min, 13000 rpm, RT, Tischzentrifuge) und der Niederschlag nach Entfernen des Überstandes in 100 µl SolA resuspendiert. Nachfolgend wurden in 5-Minuten-Abständen nacheinander 200 µl SolB und 150 µl SolC dazugemischt. Die Inkubation erfolgte auf Eis. Nach Zentrifugation (10 min, 14000 rpm, RT, Tischzentrifuge) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 400 µl Chloroform versetzt und erneut zentrifugiert (15 min, 14000 rpm, 4°C, Tischzentrifuge). Die obere Phase wurde in ein neues Cup überführt und mit 400 µl Isopropanol versetzt. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 14000 rpm, 20 min, 4°C in der Tischzentrifuge. Das Pellet wurde anschließend mit 400 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und der verbliebene Alkohol restlos entfernt. Die sedimentierte DNA wurde in 30 µl Wasser aufgenommen, für 10 min bei RT auf dem Eppendorf-Schüttler gelöst und bei -20°C gelagert.

Kochende Lyse

Es wurden 1,5 ml ÜNK in einem Reaktionsgefäß abzentrifugiert (1 min, 13000 rpm, RT, Tischzentrifuge) und der Niederschlag nach Entfernen des Überstandes in 350 µl Stet-Puffer und 25 µl Lysozym 5 min schüttelnd inkubiert. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben 40 sec bei 95°C in einem Eppendorf Heizblock inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (10 min, 14000 rpm, RT, Tischzentrifuge) wurde das Pellet mit Hilfe eines Zahnstochers entfernt. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurden 40 µl 3 M Natriumacetat-Lösung und 400 µl Isopropanol zugegeben, gemischt und zentrifugiert (10 min, 14000 rpm, RT, Tischzentrifuge). Das Pellet wurde in 70 % Ethanol gewaschen, 5 min getrocknet, in 30 µl TE mit 0,1 mg/ml RNaseA aufgenommen und 30 min bei RT im Eppendorf-Schüttler gelöst.

5.2.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* - präparativer Maßstab

Die Präparation im von Plasmid-DNA im größeren Maßstab erfolgte mit dem Jetstar Maxi-Kit der Firma Genomed nach Herstellerangaben.

5.2.3 Präparation DNA aus *U. maydis* für PCR

Eine Kultur von *U. maydis* wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 - 0,4 auf YEPS angezogen und 2 ml davon wurden in einem Reaktionsgefäß abzentrifugiert (13000 rpm, 1 min, RT, Tischzentrifuge). Das Sediment wurde in 500 µl Lysis-Puffer resuspendiert und anschließend mit 0,3 g Glasperlen (425-600 Micron) und 500 µl Phenol/Chloroform versetzt. Der Ansatz wurde auf dem Vortexer geschüttelt (10 min, RT) und nachfolgend zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, RT, Tischzentrifuge). 450 µl des Überstandes wurden mit 315 µl Isopropanol gemischt und erneut zentrifugiert (14000 rpm, 10 min, RT, Tischzentrifuge). Das Pellet wurde mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Dann wurde das Sediment in 50 µl TE mit RNaseA aufgenommen, 30 min bei RT im Eppendorf-Schüttler gelöst und bei -20°C gelagert.

5.2.4 Präparation von DNA aus *U. maydis* für Southern Blot

15 ml einer Übernachtskultur von *U. maydis* wurden in einem 15 ml Falcon-Röhrchen abzentrifugiert (4300 rpm, 15 min, 4°C, Heraeus-Zentrifuge). Das Medium wurde verworfen und die Zellen in 1 ml Wasser resuspendiert. Es erfolgte eine Zentrifugation (4300 rpm, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde mit 200 µl Lysis-Puffer und 0,3g Glasperlen (425-600 Micron) versetzt. Nach Zugabe von 200 µl Phenol/Chloroform wurde 3,5 min gevortext. Anschließend wurden 200 µl TE-Puffer zugesetzt. Das Gemisch wurde abzentrifugiert (4000 rpm, 15 min, 4°C). Der Überstand wurde in ein Eppendorf-Cup gegeben. Es wurde 1 ml 96 % Ethanol zugegeben, gemischt und abzentrifugiert (4000 rpm, 2 min, 4°C, Tischzentrifuge). Das Pellet wurde 10 min getrocknet und in 400 µl TE mit 0,1 mg/ml RNaseA gelöst. Die Lösung wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Extraktion wurden 400 µl Phenol/Chloroform zugegeben und nach Vortexen abzentrifugiert (13000 rpm, 15 min, RT,

Tischzentrifuge). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Cup überführt und mit 11 µl 3 M Natriumacetat versetzt. Anschließend wurde 1 ml Ethanol zugegeben und gemischt. Nach Zentrifugation (14000 rpm, 2 min, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Schließlich wurde es nach einer 10 minütigen Trocknung bei RT in 50 µl TE resuspendiert. Hierfür wurde es für 30 min bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert.

5.3 Amplifikation und Klonierung von DNA

5.3.1 Amplifikation von DNA über Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet (Innis and Gelfand, 1990). Mit Hilfe der PCR-Amplifikation können definierte DNA-Sequenzen aus einem komplexen DNA-Gemisch selektiv angereichert werden. Man benötigt hierzu zwei Primer, von denen der eine zum 3'-Bereich der gewünschten Sequenz und der andere zum Gegenstrang des 5'-Bereiches komplementär ist. Die Reaktionen wurden in einem Trio-Thermoblock (Biometra) oder einem Personal Cycler (Biometra) durchgeführt. Es wurde wahlweise die Taq-Polymerase oder die Pfx-Polymerase mit Korrekturlese-Funktion verwendet.

Reaktions-Ansatz (Taq-Polymerase)

- 10 % (v/v) Taq-Puffer (10x)
- 1,5 mM MgCl₂
- 0,2 mM dNTPs
- je 0,5 µM Primer 1 und Primer 2
- 0,5 U Taq-Polymerase
- 10-100 ng DNA-Matrize

PCR-Programm:

30-35x	10 min,	94°C	anfänglicher Denaturierungs-Schritt
	1 min,	94°C	Denaturierung
	1 min,	40-70°C	Anlagerung der Primer, Temperatur abhängig vom Primer
	1 min je 1 kb,	72°C	Elongation
	10 min,	72°C	finale Polymerisation

Reaktions-Ansatz (Pfx-Polymerase)

10 % (v/v) Pfx-Amplifikationpuffer (10x)
1 mM MgSO₄
0,3 mM dNTPs
je 0,3 µM Primer 1 und Primer 2
0,5 U Pfx-Polymerase
0,01-100 ng DNA-Matrize

PCR-Programm:

30-35 x	2 min,	94°C	anfänglicher Denaturierungs-Schritt
	15 sec,	94°C	Denaturierung, Temperatur abhängig vom Primer
	1 min je 1 kb,	68°C	Elongation
	10 min,	68°C	finale Polymerisation

Die Wahl der Hybridisierungstemperatur war abhängig von der Schmelztemperatur der Primer. Diese ist definiert als die Temperatur, bei der die Hälfte der Primer mit DNA gepaart, die andere Hälfte aber ungebunden vorliegt. Die Hybridisierungstemperatur wurde jeweils 5°C niedriger als die Schmelztemperatur des Primers mit der niedrigeren Schmelztemperatur gewählt. Die Reaktionsprodukte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

5.3.2 Restriktions-Analyse von DNA

Zum Schneiden von DNA wurden Restriktions-Endonukleasen und die dazugehörigen Puffersysteme der Firmen New England Biolabs und Amersham Pharmacia nach Herstellerangaben verwendet. Zusätzlich wurden die Reaktionen mit einer Endkonzentration von 50 µg/µl RNaseA versetzt.

Bei Verwendung zweier Enzyme wurde der Puffer gewählt, bei dem beide Enzyme die höchste Aktivität hatten, ohne jedoch Star-Aktivitäten aufzuweisen. War dies nicht möglich oder weniger optimal, so wurde die DNA zunächst mit dem einem Enzym geschnitten und dann mit 1 Volumen Isopropanol gefällt (10 min, 4°C, 14000 rpm, Tischzentrifuge). Nach dem Waschen mit 70 % Ethanol, nochmaligem Zentrifugieren und anschließendem Trocknen wurde das Pellet in wenigen µl H₂O (Braun) gelöst und die DNA mit dem zweiten Enzym geschnitten.

5.3.3 Dephosphorylierung von DNA

Zur Verhinderung einer Religation von linearisierten Plasmiden in einer späteren Ligation wurden die 5'-Enden durch alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP) dephosphoryliert. Dazu wurden 44 µl DNA-Lösung mit 5 µl 10 x CIAP-Puffer und 1 µl CIAP versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Zur vollständigen Inaktivierung des Enzyms wurden der Reaktion 150 µl H₂O und 200 µl Phenol/Chloroform beigelegt. Nach gründlichem Durchmischen der Phasen wurde für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die enthaltene DNA mit 2 Volumen 96 %igem Ethanol gefällt. Nach dem Waschen des Pellets mit 70 % Ethanol und vollständigem Trocknen wurde die DNA in 10 µl H₂O gelöst.

Alternativ wurde die DNA mit alkalischer Phosphatase aus Shrimps (SAP) dephosphoryliert. Hier wurden 44 µl DNA-Lösung mit 5 µl SAP-Puffer und 1 µl SAP 1 h bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung erfolgte hier durch Inkubation für 15 min bei 65°C. Eine anschließende Fällung war hier nicht nötig.

5.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die kovalente Verknüpfung zweier oder auch mehrerer DNA-Fragmente ist mit T4-DNA-Ligase möglich. Für die Ligation von Fragmenten in ein geöffnetes Plasmid wurden 100 ng dephosphorylierte Plasmid-DNA mit 1 µl 10 x Ligase-Puffer, 0,5 U T4-DNA-Ligase und bis zu 7,5 µl Lösung des oder der zu klonierenden Fragmente vermengt (10 µl Endvolumen). Nach einer Inkubation von 2-3 h bei RT oder ÜN bei 14°C wurde 1 µl des Ansatzes in elektrokompetente oder chemokompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

5.4 Analyse von DNA

5.4.1 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Ermittlung der DNA-Konzentration in wässrigen Lösungen wurden verschiedene Verdünnungen auf ein Ethidiumbromid-haltiges Agarose-Gel aufgetragen. Als Mengen-Referenz diente λ -DNA (10, 30, 60 ng). Nach kurzer Gelelektrophorese konnte die Konzentration anhand der Banden-Intensität im Vergleich zur λ -DNA ermittelt werden.

5.4.2 Trennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung verschiedener DNA-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese wurde eine horizontale Elektrophorese-Apparatur verwendet. Eine Suspension von 0,8 bis 2 % Agarose in TAE-Puffer wurde bis zum vollständigen Lösen der Agarose aufgekocht und auf ca. 60°C erkalten lassen. Anschließend wurde die Lösung mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 1-5 µg/ml) und in einen Gelschlitten mit eingestecktem Gelkamm gegossen. Nach dem Erstarren wurde der Gelkamm gezogen und der Schlitten in die mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Apparatur gelegt.

Die Proben wurden mit DNA-Auftragspuffer versetzt und in die Taschen gegeben. Als Größen-Standard diente mit *Pst*I vollständig geschnittene λ -DNA (s. Material). Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 25 – 100 V. Da sich das Ethidiumbromid in die

DNA einlagert, konnte diese anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht und photographiert werden.

Nach der Gelelektrophorese konnten einzelne Banden aus den Agarose-Gelen ausgeschnitten und die DNA daraus isoliert werden. Hierzu wurde der QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben verwendet.

5.4.3 DNA-Sequenzierung

Zur Bestimmung einer DNA-Sequenz wurde die Kettenabbruch-Methode durch Didesoxyribonukleotide nach Sanger (Sanger et al., 1977) gewählt. Die zu sequenzierende Plasmid-DNA dient hierbei während einer Polymerase-Kettenreaktion als Matrize. Die Didesoxyribonucleotide, die zum Kettenabbruch führen, sind mit verschiedenen Fluoreszenzträgern markiert. Es wurden 5 pmol Primer und ca. 400 ng gelöste DNA je Reaktion eingesetzt. Diese Komponenten wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 2 µl BigDye Terminator v3.1 Cycle Mix und 3 µl Reaction Buffer versetzt und einer PCR mit folgenden Parametern unterworfen:

25x	1 min,	99°C	anfänglicher Denaturierungs-Schritt
	10 sec,	96°C	Denaturierung
	30 sec,	50°C	Anlagerung der Primer
	4 min,	60°C	Elongation

Anschließend wurde das Reaktionsgemisch durch Zugabe von 10 µl 125 mM EDTA, 9 µl 3 M Natriumacetat, 80 µl Wasser und 400 µl Ethanol (96 %) gefällt. Nach 15 Minuten Inkubation bei RT erfolgte eine Zentrifugation für 20 Minuten bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge. Anschließend wurde zwei mal mit Ethanol (70 %) gewaschen und jeweils für fünf Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in 20 µl Formamid-Mix resuspendiert und zur Sequenzierung abgegeben.

5.4.4 Transfer und Detektion von DNA auf Membranen

Zur Auffindung von DNA-Restriktionsfragmenten bestimmter Größen wurde die Southern-Blotting Methode durchgeführt (Southern, 1975). Die nach der gelelektrophoretischen Auftrennung auf eine Nylon-Membran übertragenen DNA-Fragmente können hierbei durch anschließende Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde detektiert werden.

Transfer von DNA (Southern Blotting)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung eines Restriktionsansatzes von genomischer oder auch Plasmid-DNA auf einem 0,8 %igem Agarose-Gel wurde dieses zur Dokumentation unter UV-Licht photographiert. Nacheinander wurde es dann für 15 min zur Depurinierung in 0,25 M HCl und für 15 min zur Denaturierung in 0,4 M NaOH bei leichtem Schwenken inkubiert.

Für den Transfer auf eine Biodyne B – Nylonmembran wurde die aufwärts gerichtete Methode gewählt. Hierzu wurde eine Schale mit 0,4 M NaOH gefüllt. Über die Schale wurde ein Deckel quer gelegt. Über diesen Deckel wurde ein mit 0,4 M NaOH getränkter Streifen Whatman-Papier so gelegt, dass beide Enden in die NaOH-Lösung hingen. Dieser wurde mit drei Lagen NaOH getränktem Whatman-Papier überschichtet. Anschließend folgte das Gel, so orientiert, dass seine Taschenöffnungen unten lagen. Auf dieses wurde die Nylonmembran, gefolgt von drei Schichten Whatman-Papier und einem dicken Stapel saugfähigem Laborpapier, gelegt. Zwischen das Gel und die Membran wurde zur seitlichen Abdichtung an den Rändern etwa 5 mm weit wasserdichter Parafilm eingeführt. Auf diese Konstruktion wurde zur Beschwerung ein Gewicht von etwa 400 g gelegt. Das Blotten erfolgte über Nacht: Die NaOH-Lösung wurde dabei von dem Papier durch das Gel und die Membran nach oben gesaugt. Hierdurch wurde die DNA auf die Membran überführt.

Anschließend wurde die Membran getrocknet und die DNA durch UV-Bestrahlung (UV-Stratalinker) auf der Membran fixiert.

Herstellung radioaktiver DNA-Sonden

Zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten wurde der Megaprime Labeling Kit verwendet. Das ausgewählte DNA-Restriktions-Fragment (ca. 25 ng) wurde mit 5 µl des im Kit vorhandenen Primers versetzt und mit H₂O auf 33 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 5 min bei 95°C denaturiert. Nachfolgend wurden 10 µl Labeling-Puffer Lösung und 5 µl radioaktives [³²P]αdCTP beigelegt. Durch Zugabe von 2 µl Klenow-Enzym-Lösung wurde

die Reaktion gestartet und der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Durch den Einbau des [³²P]αdCTPs in die neu synthetisierten DNA-Stränge wurden diese radioaktiv markiert.

Zur Entfernung der nicht eingebauten Nukleotide wurde der Ansatz über eine MobiSpin S-200 Sephacryl-Säule nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Sonde wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Hybridisierung

Die auf der Nylon-Membran fixierte DNA wurde nach der Methode von Church und Gilbert (Church and Gilbert, 1984) mit der radioaktiven Sonde hybridisiert. Zunächst wurde die Membran für 20 min bei 60°C mit Southern-Hybridisierungspuffer vorinkubiert. Die für 5 min bei 95°C denaturierte Sonde wurde zugegeben und der Ansatz über Nacht bei 65°C im Hybridisierungssofen drehend inkubiert.

Die Hybridisierungs-Lösung wurde entfernt und die Membran zweimal mit 20 ml Southern-Waschpuffer für jeweils 20 min bei 65°C gewaschen. Nach dem Einschlagen der Membran in Klarsichtfolie wurde ein Storage Phosphor-Screen (Amersham) über Nacht mit der strahlenden Membran belichtet. Dieser wurde dann mit einem STORM 860 Phosphoimager (Molecular Dynamics) analysiert und die erhaltenen Signale mit der Software STORM Image Quant analysiert.

5.5 Präparation von RNA

Zur Präparation von RNA wurden ausschließlich autoklavierte Gefäße und Materialien verwendet, alle wässrigen Lösungen waren durch Zugabe von 1/1000 Vol DEPC von RNAsen befreit worden.

Zur Präparation wurden 15 ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von ca. 500 abzentrifugiert (10 min, 4000 rpm, 4°C, Laborzentrifuge). Nach Entfernung des Mediums wurde das Pellet in 400 ml AE-Puffer resuspendiert und in ein Eppendorf-Cup überführt. Es wurden 40 µl 10 % SDS zugegeben, gevortext und direkt anschließend 400 µl 65°C warmes mit AE-Puffer gesättigtes Phenol zugegeben, gevortext und 10 min schüttelnd auf 65°C Eppendorfeisblock inkubiert. Es folgte eine Inkubation für 5 min bei -80°C und eine anschließende Zentrifugation (2 min, 13000 rpm, 4°C, Laborzentrifuge). Die RNA wurde zum weiteren Reinigen mit 400 µl Phenol/Chloroform versetzt, gevortext und erneut zentrifugiert (10 min, 13000 rpm, 4°C,

Laborzentrifuge). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zuführen von 1/10 Vol 3 M Natriumacetat-Lösung und 1 Vol 98 % Ethanol, Vortexen und Zentrifugieren (10 min, 13000 rpm, 4°C, Laborzentrifuge) gefällt. Die RNA wurde nun mit 70 % Ethanol gewaschen und in 30 µl TE mit 1 % Proteinase K aufgenommen. Die präparierte RNA wurde direkt für weitere Analyse eingesetzt oder bei –80°C gelagert.

5.6 Analyse von RNA

5.6.1 Auftrennung von RNA durch Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von RNA-Molekülen durch Agarose-Gelelektrophorese wurde eine horizontale Elektrophorese-Apparatur verwendet. Eine Suspension von 1 % Agarose in MOPS-Puffer wurde bis zum vollständigen Lösen der Agarose aufgekocht und auf ca. 60°C erkalten lassen. Anschließend wurde die Lösung mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 1-5 µg/ml) und in einen Gelschlitten mit eingestecktem Gelkamm gegossen, der zuvor mit RNase-Away (Invitrogen) behandelt worden war. Nach dem Erstarren wurde der Gelkamm gezogen und der Schlitten in die mit MOPS-Puffer gefüllte RNase-freie Elektrophorese-Apparatur gelegt.

Die RNA-Proben (etwa 2,5 µg) wurden in einem Endvolumen von 40 µl mit 2 µl MOPS (10 x), 2 µl Glyoxal (8 M), und 10 µl DMSO versetzt und zwischen 30 Minuten und einer Stunde bei 50°C inkubiert. Anschließend wurden 6 µl RNA-Auftragspuffer zugegeben und die Proben wurden in die Taschen gegeben. Als Größen-Standard diente mit *Pst*I vollständig geschnittene λ-DNA (s. Material). Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 90 V. Alle 30 min wurde die Polung der Kammer und die Orientierung des Gels in der Kammer umgekehrt, um den pH-Wert des Puffers möglichst konstant zu halten. Da sich das Ethidiumbromid in die RNA einlagert, konnte diese anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht und photographiert werden.

5.6.2 Transfer und Detektion von RNA auf Membranen

Zur Untersuchung der Expressionsstärke eines Genes wurde die Northern Blotting Methode angewandt. Die nach der gelelektrophoretischen Auftrennung auf eine Nylon-Membran übertragene RNA kann hierbei durch anschließende Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde detektiert werden.

Transfer von RNA (Northern Blotting)

Für den Transfer auf eine Biodyne B – Nylonmembran wurde die aufwärts gerichtete Methode gewählt. Hierzu wurde eine Wanne mit 20 x SSC gefüllt. Über die Wanne wurde eine Glasplatte quer gelegt. Über diese Glasplatte wurde ein mit 20 x SSC getränkter Streifen Whatman-Papier so gelegt, dass beide Enden in die 20 x SSC-Lösung hingen. Dieser wurde mit drei Lagen 20 x SSC getränktem Whatman-Papier überschichtet. Anschließend folgte das zuvor für eine Viertelstunde in 20 x SSC gebadete Gel, so orientiert, dass seine Taschenöffnungen unten lagen. Auf dieses wurde die Nylonmembran, gefolgt von drei Schichten Whatman-Papier und einem dicken Stapel saugfähigem Laborpapier gelegt. Zwischen das Gel und die Membran wurde zur seitlichen Abdichtung an den Rändern etwa 5 mm weit wasserdichter Parafilm eingeführt. Auf diese Konstruktion wurde zur Beschwerung ein Gewicht von etwa 400 g gelegt. Das Blotten erfolgte über Nacht: Die 20 x SSC-Lösung wurde dabei von dem Papier durch das Gel und die Membran nach oben gesaugt. Hierdurch wurde die RNA auf die Membran überführt.

Anschließend wurde die Membran 30 min getrocknet und die RNA durch UV-Bestrahlung (UV-Stratalinker) auf der Membran fixiert.

Hybridisierung

Die auf der Nylon-Membran fixierte DNA wurde nach der Methode von Church und Gilbert (Church and Gilbert, 1984) mit der radioaktiven Sonde hybridisiert. Zunächst wurde die Membran für 20 min bei 60°C mit Northern-Hybridisierungspuffer vorinkubiert. Die für 5 min bei 95°C denaturierte Sonde wurde zugegeben und der Ansatz über Nacht bei 60°C im Hybridisierungssofen drehend inkubiert.

Die Hybridisierungs-Lösung wurde entfernt und die Membran zweimal mit 20 ml Northern-Waschpuffer für jeweils 20 min bei 60°C gewaschen. Nach dem Einschweißen der Membran in Klarsichtfolie wurde diese in einer Phosphorimager Kassette exponiert. Die Detektion

der radioaktiven Signale wurde dann mit Hilfe eines Phosphoimagers (Storm860, der Fa. Amersham, Braunschweig) ausgewertet.

Stripping

Um die hybridisierte Sonde wieder von der Membran zu entfernen (Stripping), bevor diese mit einer anderen Sonde hybridisiert wurde, wurde sie mit Northern-Strip-Puffer versetzt und für zwei Stunden bei 85°C im Hybridisierungsofen drehend inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit Northern-Waschpuffer 20 min bei 65°C gewaschen. Dann konnte sie für eine erneute Hybridisierung eingesetzt werden.

5.6.3 Quantifizierung der Bandenintensität

Zur Quantifizierung der Intensität von im Northern Blot erhaltenen RNA-Banden kam die Software ImageJ (Rasband, 1997) zum Einsatz. Hierfür wurden die einzelnen Banden mit dem Tool *Rectangular Selections* markiert und der durchschnittliche Grauwert *Mean Gray Value* durch das Tool *Measure* im Menü *Analyze* bestimmt. Von diesem Wert wurde der für den Hintergrund des Blots erhaltene Wert abgezogen. Um die Werte der einzelnen Banden auf die jeweils in der Spur eingesetzte Gesamtmenge an RNA zu normieren, wurde der für die Banden erhaltene Wert durch den in der gleichen Spur für *ppi* erhaltenen Wert dividiert.

5.7 Transformationen

5.7.1 Herstellung elektro-kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung elektro-kompetenter *E. coli* wurden 2 ml einer ÜNK des Stammes DH5α auf 200 ml dYT-Medium überimpft und in einem Schikane-Kolben bei 37°C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 geschüttelt. Die Kultur wurde für 15 min auf Eis gekühlt und abzentrifugiert (10 min, 4500 rpm, 4°C, Laborzentrifuge). Das Zellsediment wurde nacheinander mit 200 ml und 50 ml sterilem H₂O sowie 5 ml und 2,5 ml 10 % Glycerin gewaschen und jeweils wie oben zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 1 ml 10 % Glycerin aufgenommen, in Reaktionsgefäßen auf 50 µl aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

5.7.2 Elektro-Transformation von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen

Zur effizienten Transformation von DNA aus Ligations-Ansätzen in *E. coli* wurde häufig die Methode der Elektroporation gewählt. Hierbei wurden 50 µl elektro-kompetente *E. coli* mit 1 µl des Ligations-Ansatzes versetzt und 1 min auf Eis inkubiert, damit sich die DNA an die Zellen anlagern konnte. Anschließend wurde das Gemisch in eine Elektroporations-Küvette überführt und bei 125 µF, 200 Ω und 2,5 kV elektroporiert (Gene Pulser, Fa. Biorad, München). Es wurde darauf geachtet, dass der ausgegebene Wert für τ bei 4,5 bis 4,7 ms lag. Die Zellen wurden in 1 ml 37°C warmem dYT-Medium aufgenommen und für 30 min bei 37°C inkubiert. 50 bis 500 µl der Zellsuspension wurden auf dYT-Agar mit Ampicillin, falls nötig mit X-Gal, ausplattiert.

5.7.3 Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen wurden 200 ml dYT-Medium mit 2 ml Übernachtskultur des Stammes DH5α versetzt und in einem Schikanekolben bei 37°C und 150 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 geschüttelt. Die Kultur wurde bei 4°C für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 ml 50 mM CaCl₂ auf Eis resuspendiert und erneut mit den gleichen Einstellungen für 10 min zentrifugiert. Dann wurde es in 5 ml 50 mM CaCl₂, 10 % Glycerin resuspendiert. Je 100 µl wurden in Eppendorf-Gefäßen aliquotiert und dann bei -80°C eingefroren.

5.7.4 Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Transformation von DNA aus Ligations-Ansätzen in chemokompetente *E. coli*-Zellen wurden 10 µl des Ligationsansatzes mit 50 µl chemokompetenten Zellen versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz für 1 min auf 42°C gebracht und anschließend sofort mit 800 µl dYT-Medium versetzt. Es erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C auf dem Schüttler bei 150 rpm. Anschließend wurden zwischen 100 und 200 µl des Ansatzes auf Selektivplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.7.5 Protoplastierung von *U. maydis*

Zur Herstellung von *U. maydis* - Protoplasten wurden eine Kultur in 50 ml YEPS-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,7 gezogen. Diese wurde zentrifugiert (3200 rpm, 10 min, 4°C, Laborzentrifuge) und das Zellsediment in 25 ml SCS-Lösung resuspendiert. Es wurde erneut zentrifugiert (3000 rpm, 10 min, 4°C, Laborzentrifuge) und das Pellet mit 2 ml SCS-*Novozym*-Lösung versetzt. Der Ansatz wurde bei 28°C inkubiert, bis ca. 80 % der Zellen als runde Protoplasten vorlagen (ca. 10 bis 45 min). Die Protoplastierung wurde durch Zugabe von 10 ml SCS-Lösung gestoppt und die Protoplasten pelletiert (2300 rpm, 10 min, 4°C, Laborzentrifuge). Das Zellsediment wurde vorsichtig nacheinander mit zweimal 10 ml SCS-Lösung und 10 ml STC-Lösung gewaschen und jeweils wie im vorhergehenden Schritt zentrifugiert. Die Protoplasten wurden in 500 µl STC-Lösung aufgenommen, auf 50 µl aliquotiert und im auf -80°C gelagert.

5.7.6 Transformation von *U. maydis*-Protoplasten

Zur Transformation von *U. maydis* wurden zu 50 µl Protoplasten-Suspension 500 ng bis 5 µg lineare oder Plasmid-DNA gegeben. Ebenso wurde jeweils eine Kontrolle mit gleichem Volumen an H₂O versetzt. Die Ansätze wurden für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 500 µl eiskalter STC/PEG-Lösung vermengt. Durch die Zugabe von PEG werden die Zellmembranen für die zugegebene DNA permeabel und diese kann in die Protoplasten aufgenommen werden. Die Gemische wurden weitere 15 min auf Eis inkubiert und anschließend auf Regenerations-Agar, bzw. YNB-Regenerationsagar mit Glukose bzw. Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle ausplattiert und unter der Sterilbank für ca. 20 min getrocknet. Die Platten enthielten als untere Schicht 10 ml Regenerations-Agar mit einer zweifachen Antibiotika-Konzentration (Hygromycin: 400 µg/ml, Carboxin 4 µg/ml, Nourseothricin: 300 µg/ml) und darüber 10 ml Regenerations-Agar ohne Antibiotikum (AB). So stellt sich in Folge der Diffusion auf der Oberfläche des Agars mit der Zeit die übliche Konzentration an AB ein, so dass vorher die Resistenz in den transformierten Protoplasten zur Ausprägung kommen kann. Die Platten wurden bei 28°C für zwei bis fünf Tage inkubiert und gebildete Kolonien auf PD-Agar bzw YNB-G- oder YNB-A-Agar mit AB vereinzelt.

5.7.7 Integration von Vektoren in den genomischen *ip*-Locus

Der häufig zur Integration von Vektorkonstrukten genutzte *cbx*-Locus wird so genannt, da er Carboxinresistenz (Cbx^R) nach Integration spezieller Vektoren vermittelt. Der *cbx*-Locus wird auch *ip*-Locus genannt. Diese speziellen Vektoren tragen ein Carboxinresistenz vermittelndes Allel des *ip*-Gens. Carboxin ist ein Fungizid, das die Eisen-Schwefel-Untereinheit der Succinat-Dehydrogenase inhibiert. Das vektorkodierte IP-Protein wird nicht durch das Fungizid inhibiert und vermittelt dadurch die Carboxinresistenz. Der Vektor kann durch *SspI* in dem *ip*-Allel linearisiert werden und nach der Transformation durch ortsspezifische, homologe Rekombination in den genomischen *ip*-Locus integrieren. Der *ip*-Locus wird durch die Integration des Vektors verdoppelt (Abb. 36). Durch die in der Abbildung 36 dargestellten Primerkombinationen kann die Integration des Konstruktes überprüft werden (Hlubek, 2004).

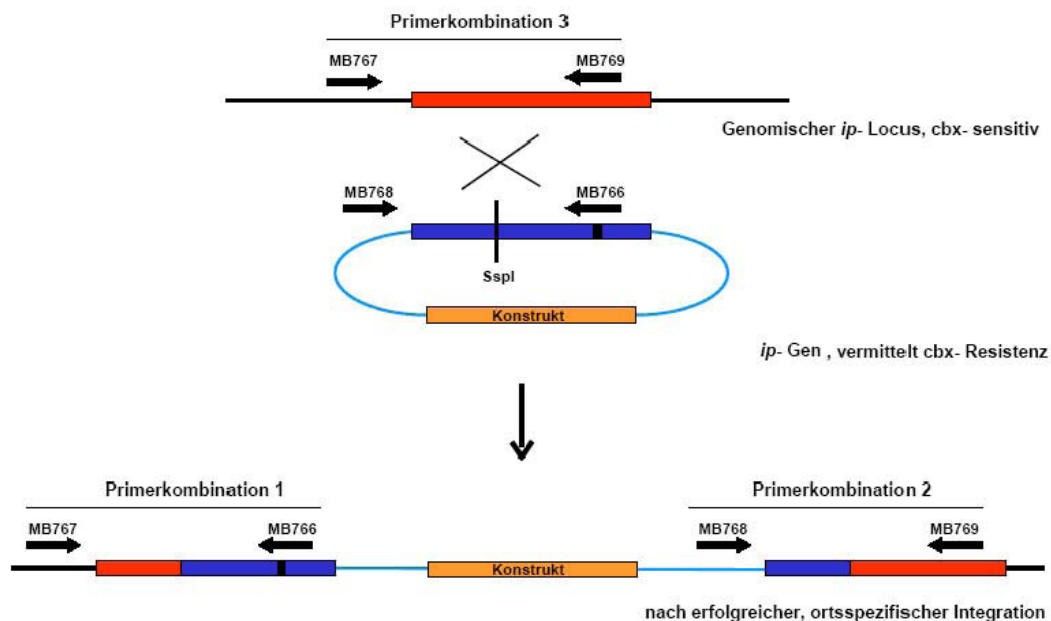


Abb. 5-1: Integration von Plasmiden in den genomischen *ip*-Locus.

Die verwendeten Plasmide tragen neben den erstellten Konstrukten das *ip_r*-Allel, welches nach Linearisierung mit dem genomischen *ip_s*-Allel rekombiniert. Ein erfolgreiches Integrationsereignis kann mit Hilfe der angegebenen Primerkombinationen überprüft werden.

5.8 Untersuchung von *U. maydis*

5.8.1 Infektion von Maispflanzen und Isolierung haploider Nachkommen

Zur Erzeugung von haploiden Nachkommen und zum Test der Pathogenität von *U. maydis* – Stämmen wurden im Gewächshaus angezogene, 7-10 Tage alte Maispflanzen des Typs Early Golden Bantam infiziert. Hierzu wurden 50 ml ÜNK auf YEPS-Medium abzentrifugiert (2500 rpm, 10 min, RT, Laborzentrifuge), mit 50 ml H₂O gewaschen und das Pellet in 1-3 ml Wasser resuspendiert. Dann wurde eine 1:1-Mischung kompetenter Kreuzungspartner hergestellt und je etwa 200 µl durch eine Spritze in den Stängel der Pflanzen injiziert. Die Pflanzen konnten nach 7-14 Tagen auf Chlorose, Anthocyan- und Tumorbildung untersucht werden. Zur Kontrolle der Pathogenität wurden die Experimente aus statistischen Gründen an mehreren Pflanzen durchgeführt.

Nach der Bildung von Tumoren an den infizierten Maispflanzen konnten daraus Sporen geerntet und auf YEPS-Agar ausplattiert werden. Nach 2-4 tägiger Inkubation bei 28°C wurden Mikrokolonien gepickt und auf YEPS-Festmedium weiter vereinzelt.

5.8.2 Test des Kreuzungsverhaltens auf Charcoal-PD-Agar

Um die Zellfusion und die anschließende Filamentbildung von kompatiblen Kreuzungspartnern zu untersuchen, können Mischungen verschiedener *U. maydis*-Stämme auf Charcoal-PD-Agar angezogen werden. Bei Kombination zweier kompatibler Kreuzungspartner kann der Übergang zum filamentösen Wachstum in Form eines weißen Mycels beobachtet werden (Day and Anagnostakis, 1971). Nicht kompatible Kreuzungspartner wachsen weiter hefeartig und bilden so Kolonien mit glatter Oberfläche aus.

Zur Identifikation des Kreuzungsverhaltens eines *U. maydis*-Stammes wurde eine ÜNK dieses Stammes mit der eines kompatiblen Kreuzungspartners im Verhältnis 1:1 gemischt und 5-10 µl jeder Kombination auf Charcoal-PD-Agar aufgetropft. Kombinationen der Wildtypen untereinander dienten als Kontrollen. Nach Inkubation für 2 Tage bei 22°C ließen sich die Kreuzungen auswerten.

5.8.3 Mikroskopie

Für die fluoreszenzmikroskopische Analyse von *U. maydis* kam ein Fluoreszenzmikroskop des Typs Axioskop 2 (Firma Zeiss) zum Einsatz. Für die Mikroskopie wurden 5 µl einer frischen Übernachtskultur auf einen mit 1,5 % Agarose beschichteten Objektträger aufgetropft und dieser mit einem Deckglas versehen. Die Mikroskopie erfolgte unter DIC-Belichtung oder mittels Epifluoreszenz. Hierbei wurden folgende Filtersätze verwendet: DAPI (Anregung: 365 nm, Farbteiler: 395 nm, Emission: >397 nm), FITC (Anregung: 450-490 nm, Farbteiler: 510 nm, Emission: 515-565 nm), Rhodamin (Anregung: 546 nm, Farbteiler: 580 nm, Emission: >590 nm). Aufnahmen wurden mit einer hoch auflösenden CCD-Kamera (Typ Mega Fire, INTAS) und der Software MagnaFire 2.0 erstellt. Kontrastverstärkung, Skalierung von Maßstäben, die Vergrößerung von Bildausschnitten und die farbliche Überlagerung von Aufnahmen wurden mit der Software Adobe-Photoshop 6.0 durchgeführt.

5.8.3.1 Färbungen

Folgende Fluoreszenz-Farbstoffe wurden für die Mikroskopie eingesetzt:

Tab. 4.9: Verwendete Farbstoffe.

Farbstoff	Anregung (nm)	Emmission (nm)	Verwendete Konzentration
Calcofluor white	395	440	2 µg/ml
DAPI	358	461	2 µg/ml
SYTO11	508	527	5 nM
FM4-64	508	640	16 µM
CMAC	350	466	100 µM
GFP	475	508	-

Kernfärbung

Für die Kernfärbung mittels DAPI wurden Übernachtskulturen abzentrifugiert in der Tischzentrifuge bei 5000 rpm für fünf Minuten abzentrifugiert und in 70 % Ethanol in 1 x PBS resuspendiert, um sie zu fixieren. Anschließend wurden sie in 1 x PBS gewaschen und mit 2 µg/ml DAPI versehen. Die Färbung wurde mit dem DAPI-Filter betrachtet. Alternativ wurden die Kerne durch Zugabe von 5 nM SYTO11 zu den auf den Objektträger aufgebrauchten Zellen einer Übernachtskultur gefärbt.

Septen- und Zellwandfärbung

Für die Visualisierung der Septen und der Zellwand Zellwandfärbung wurde der Farbstoff Calcofluor white sowie WGA (wheat germ agglutinin) verwendet. Calcofluor white färbt neu gebildetes Zellwandmaterial (Mitchison and Nurse, 1985). Es wurde in Konzentrationen von 2 µg/ml zu frischen Übernachtskulturen zugegeben. Nach 10 Minuten Inkubation wurden die Zellen auf einen Objektträger gegeben und im Lichtmikroskop mit DAPI-Filtersatz betrachtet. Rhodamin-gekoppeltes WGA ist ein spezifischer Farbstoff für Chitin (Nagata and Burger, 1974). Die Färbung erfolgte mit 25 µg/ml für 5 min und anschließender Betrachtung mit dem Rhodamin-Filtersatz.

Vakuolenfärbung

Vakuolen wurden mit CellTracker™blue (CMAC) gefärbt. Hierfür wurde eine frische Übernachtskultur mit 100 µM CMAC versehen und für fünf Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem DAPI-Filtersatz betrachtet. Bei gleichzeitiger Färbung mit dem Farbstoff FM4-64 wurde die FM4-64-Färbung wie beschrieben durchgeführt und nach Ablauf von 45 Minuten der Farbstoff CMAC in der angegebenen Konzentration zugesetzt.

Endocytosefärbung

Zellen aus einer logarithmischen Kultur wurden für 1-3 min mit 16 µM FM4-64 (Vida and Emr, 1995) bei RT gefärbt (Puls). Anschließend wurden die Zellen für 1 min bei 5000 rpm pelletiert und in Wasser resuspendiert. Nach 60 min (chase) wurden die Zellen auf einen Objektträger gegeben und mit dem Rhodamin- Filtersatz betrachtet. Um die Endocytose zeitlich zu verfolgen, wurden die Zellen wie oben beschrieben gefärbt und nach der Resuspendierung in Wasser unverzüglich auf den Objektträger gegeben. Der Verlauf der Endocytose konnte dann in zeitlich definierten Abständen verfolgt werden.

5.8.3.2 Movies

Zur Erstellung von Wachstumsfilmen wurde das Wachstum von bestimmten Zellen über einen längeren Zeitraum mikroskopisch verfolgt. Hierfür wurden Zellen einer frischen ÜNK mit YNB-G- oder YNB-A-Medium gewaschen und 4 µl wurden auf einen Objektträger aufgetropft, in dessen Mitte sich eine Vertiefung befand. Zuvor wurde in diese Vertiefung wurde zuvor YNB-G- oder YNB-A-Medium gefüllt, das zusätzlich 1,5 % *Agarose medium EEO* (Biomol) enthielt. Nach 30 minütiger Inkubation bei 28°C wurde der Objektträger mit einem Deckglas versehen und die Zellen wurden mikroskopiert. In festen Intervallen wurden DIC-Aufnahmen erstellt. Die Bilder wurden mit der Software Adobe Photoshop 6.0 bearbeitet und mit der Software Adobe ImageReady 2.0 als QuickTime Movie animiert. Die Zeitintervalle wurden hierbei so gewählt, dass eine Sekunde Filmzeit einem Zeitintervall von 60 Minuten Realzeit entsprechen.

6 Literatur

- Adams, A.E., Johnson, D.I., Longnecker, R.M., Sloat, B.F. and Pringle, J.R. (1990) CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **111**, 131-142.
- Adamson, P., Marshall, C.J., Hall, A. and Tilbrook, P.A. (1992) Post-translational modifications of p21rho proteins. *J Biol Chem*, **267**, 20033-20038.
- Alspaugh, J.A., Cavallo, L.M., Perfect, J.R. and Heitman, J. (2000) RAS1 regulates filamentation, mating and growth at high temperature of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*, **36**, 352-365.
- Andrews, D.L., Egan, J.D., Mayorga, M.E. and Gold, S.E. (2000) The *Ustilago maydis* *ubc4* and *ubc5* genes encode members of a MAP kinase cascade required for filamentous growth. *Mol Plant Microbe Interact*, **13**, 781-786.
- Arnould, T., Kim, E., Tsiokas, L., Jochimsen, F., Gruning, W., Chang, J.D. and Walz, G. (1998) The polycystic kidney disease 1 gene product mediates protein kinase C alpha-dependent and c-Jun N-terminal kinase-dependent activation of the transcription factor AP-1. *J Biol Chem*, **273**, 6013-6018.
- Bagrodia, S., Derijard, B., Davis, R.J. and Cerione, R.A. (1995) Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem*, **270**, 27995-27998.
- Banuett, F. and Herskowitz, I. (1989) Different *a* alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**, 5878-5882.
- Banuett, F. and Herskowitz, I. (1994a) Identification of *fuz7*, a *Ustilago maydis* MEK/MAPKK homolog required for *a*-locus-dependent and -independent steps in the fungal life cycle. *Genes Dev*, **8**, 1367-1378.
- Banuett, F. and Herskowitz, I. (1994b) Morphological transitions in the life cycle of *Ustilago maydis* and their genetic control by the *a* and *b* loci. *Experimental Mycology*, **18**, 247-266.
- Banuett, F. and Herskowitz, I. (1996) Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development*, **122**, 2965-2976.
- Bar-Sagi, D. and Feramisco, J.R. (1986) Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblasts by ras proteins. *Science*, **233**, 1061-1068.
- Bassilana, M. and Arkowitz, R.A. (2006) Rac1 and Cdc42 have different roles in *Candida albicans* development. *Eukaryot Cell*, **5**, 321-329.
- Bauer, A. (2006) Identifizierung von Effektoren für GTPasen der Ras- und Rac-Familie in *Ustilago maydis*. Diplomarbeit. *Fachbereich Biologie*. Philipps-Universität, Marburg.
- Birnboim, H. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- Bokoch, G.M. (1995) Regulation of the phagocyte respiratory burst by small GTP-binding proteins. *Trends Cell Biol*, **5**, 109-113.
- Bölker, M. (2001) *Ustilago maydis* - a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology*, **147**, 1395-1401.
- Bölker, M., Genin, S., Lehmler, C. and Kahmann, R. (1995) Genetic regulation of mating and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Can J Bot*, **73**, S320-S325.
- Bölker, M., Urban, M. and Kahmann, R. (1992) The *a* mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell*, **68**, 441-450.

- Bourne, H.R., Sanders, D.A. and McCormick, F. (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*, **348**, 125-132.
- Boyce, K., Hynes, M. and Andrianopoulos, A. (2005a) The Ras and Rho GTPases genetically interact to co-ordinately regulate cell polarity during development in *Penicillium marneffei*. *Molecular Microbiology*, **55**, 1487-1501.
- Boyce, K.J., Chang, H., D'Souza, C.A. and Kronstad, J.W. (2005b) An *Ustilago maydis* septin is required for filamentous growth in culture and for full symptom development on maize. *Eukaryot Cell*, **4**, 2044-2056.
- Boyce, K.J., Hynes, M.J. and Andrianopoulos, A. (2001) The CDC42 homolog of the dimorphic fungus *Penicillium marneffei* is required for correct cell polarization during growth but not development. *J Bacteriol*, **183**, 3447-3457.
- Boyce, K.J., Hynes, M.J. and Andrianopoulos, A. (2003) Control of morphogenesis and actin localization by the *Penicillium marneffei* RAC homolog. *J Cell Sci*, **116**, 1249-1260.
- Brachmann, A., Konig, J., Julius, C. and Feldbrugge, M. (2004) A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics*, **272**, 216-226.
- Brachmann, A., Weinzierl, G., Kämper, J. and Kahmann, R. (2001) Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **42**, 1047-1063.
- Broek, D., Samiy, N., Fasano, O., Fujiyama, A., Tamanoi, F., Northup, J. and Wigler, M. (1985) Differential activation of yeast adenylate cyclase by wild-type and mutant RAS proteins. *Cell*, **41**, 763-769.
- Burridge, K. and Wennerberg, K. (2004) Rho and Rac take center stage. *Cell*, **116**, 167-179.
- Carazo-Salas, R.E., Gruss, O.J., Mattaj, I.W. and Karsenti, E. (2001) Ran-GTP coordinates regulation of microtubule nucleation and dynamics during mitotic-spindle assembly. *Nat Cell Biol*, **3**, 228-234.
- Cerione, R.A. and Zheng, Y. (1996) The Dbl family of oncogenes. *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 216-222.
- Chang, E.C., Barr, M., Wang, Y., Jung, V., Xu, H.P. and Wigler, M.H. (1994) Cooperative interaction of *S. pombe* proteins required for mating and morphogenesis. *Cell*, **79**, 131-141.
- Chen, C. and Dickman, M.B. (2004) Dominant active Rac and dominant negative Rac revert the dominant active Ras phenotype in *Colletotrichum trifolii* by distinct signalling pathways. *Mol Microbiol*, **51**, 1493-1507.
- Chen, C., Li, Y., Chen, J., Hou, M., Papadaki, P. and Chang, E. (1999) Moe1, a conserved protein in *Schizosaccharomyces pombe*, interacts with a Ras effector, Scd1, to affect proper spindle formation. The National Academy of Sciences.
- Chen, F., Ma, L., Parrini, M.C., Mao, X., Lopez, M., Wu, C., Marks, P.W., Davidson, L., Kwiatkowski, D.J., Kirchhausen, T., Orkin, S.H., Rosen, F.S., Mayer, B.J., Kirschner, M.W. and Alt, F.W. (2000) Cdc42 is required for PIP(2)-induced actin polymerization and early development but not for cell viability. *Curr Biol*, **10**, 758-765.
- Chen, W., Lim, H.H. and Lim, L. (1993) The CDC42 homologue from *Caenorhabditis elegans*. Complementation of yeast mutation. *J Biol Chem*, **268**, 13280-13285.
- Chong, C., Tan, L., Lim, L. and Manser, E. (2001) The mechanism of PAK activation. Autophosphorylation events in both regulatory and kinase domains control activity. *J Biol Chem*, **276**, 17347-17353.
- Choy, E., Chiu, V.K., Silletti, J., Feoktistov, M., Morimoto, T., Michaelson, D., Ivanov, I.E. and Philips, M.R. (1999) Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell*, **98**, 69-80.
- Christensen, J.J. (1963) *Corn Smut Caused by Ustilago maydis*. Monograph No. 2. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.

- Church, G. and Gilbert, W. (1984) Genomic Sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **81**, 1991-1995.
- Cullen, P. and Sprague, G. (2002) The Glc7p-Interacting Protein Bud14p Attenuates Polarized Growth, Pheromone Response, and Filamentous Growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, **1**, 884-894.
- Cvrckova, F., De Virgilio, C., Manser, E., Pringle, J.R. and Nasmyth, K. (1995) Ste20-like protein kinases are required for normal localization of cell growth and for cytokinesis in budding yeast. *Genes Dev*, **9**, 1817-1830.
- Davis, C.R., Richman, T.J., Deliduka, S.B., Blaisdell, J.O., Collins, C.C. and Johnson, D.I. (1998) Analysis of the mechanisms of action of the *Saccharomyces cerevisiae* dominant lethal *cdc42G12V* and dominant negative *cdc42D118A* mutations. *J Biol Chem*, **273**, 849-858.
- Day, P.R. and Anagnostakis, S.L. (1971) Corn smut dikaryon in culture. *Nat New Biol*, **231**, 19-20.
- Day, P.R. and Anagnostakis, S.L. (1973) Killer system in *Ustilago maydis* heterokaryon transfer and loss of determinants. *Phytopathology*, **63**, 1017-1018.
- Derijard, B., Hibi, M., Wu, I.H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M. and Davis, R.J. (1994) JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*, **76**, 1025-1037.
- Dhar, R., Ellis, R.W., Shih, T.Y., Oroszlan, S., Shapiro, B., Maizel, J., Lowy, D. and Scolnick, E. (1982) Nucleotide sequence of the p21 transforming protein of Harvey murine sarcoma virus. *Science*, **217**, 934-936.
- Didsbury, J., Weber, R.F., Bokoch, G.M., Evans, T. and Snyderman, R. (1989) rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J Biol Chem*, **264**, 16378-16382.
- Dotti, C.G., Sullivan, C.A. and Banker, G.A. (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci*, **8**, 1454-1468.
- Driscoll, P.C. and Vuidepot, A.L. (1999) Peripheral membrane proteins: FYVE sticky fingers. *Curr Biol*, **9**, R857-860.
- Dürrenberger, F. and Kronstad, J. (1999) The *ukc1* gene encodes a protein kinase involved in morphogenesis, pathogenicity and pigment formation in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet*, **261**, 281-289.
- Durrenberger, F., Wong, K. and Kronstad, J.W. (1998) Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 5684-5689.
- Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A.V., Mann, M. and Kirschner, M.W. (2002) Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature*, **418**, 790-793.
- Eitzen, G., Thorngren, N. and Wickner, W. (2001) Rho1p and Cdc42p act after Ypt7p to regulate vacuole docking. *Embo J*, **20**, 5650-5656.
- Eitzen, G., Wang, L., Thorngren, N. and Wickner, W. (2002) Remodeling of organelle-bound actin is required for yeast vacuole fusion. *J Cell Biol*, **158**, 669-679.
- Feig, L.A. and Cooper, G.M. (1988) Inhibition of NIH 3T3 cell proliferation by a mutant ras protein with preferential affinity for GDP. *Mol Cell Biol*, **8**, 3235-3243.
- Feng, Q., Summers, E., Guo, B. and Fink, G. (1999) Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. *J Bacteriol*, **181**, 6339-6346.
- Frech, M., Andjelkovic, M., Ingley, E., Reddy, K.K., Falck, J.R. and Hemmings, B.A. (1997) High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity. *J Biol Chem*, **272**, 8474-8481.

- Fruman, D.A., Rameh, L.E. and Cantley, L.C. (1999) Phosphoinositide binding domains: embracing 3-phosphate. *Cell*, **97**, 817-820.
- Gibbs, J.B., Sigal, I.S., Poe, M. and Scolnick, E.M. (1984) Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenic ras p21 molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 5704-5708.
- Gold, S., Duncan, G., Barrett, K. and Kronstad, J. (1994) cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes Dev*, **8**, 2805-2816.
- Gong, T.W., Shin, J.J., Burmeister, M. and Lomax, M.I. (1997) Complete cDNAs for CDC42 from chicken cochlea and mouse liver. *Biochim Biophys Acta*, **1352**, 282-292.
- Govind, S., Kozma, R., Monfries, C., Lim, L. and Ahmed, S. (2001) Cdc42Hs facilitates cytoskeletal reorganization and neurite outgrowth by localizing the 58-kD insulin receptor substrate to filamentous actin. *J Cell Biol*, **152**, 579-594.
- Hamad, N.M., Elconin, J.H., Karnoub, A.E., Bai, W., Rich, J.N., Abraham, R.T., Der, C.J. and Counter, C.M. (2002) Distinct requirements for Ras oncogenesis in human versus mouse cells. *Genes Dev*, **16**, 2045-2057.
- Han, L. and Colicelli, J. (1995) A human protein selected for interference with Ras function interacts directly with Ras and competes with Raf1. *Mol Cell Biol*, **15**, 1318-1323.
- Han, L., Wong, D., Dhaka, A., Afar, D., White, M., Xie, W., Herschman, H., Witte, O. and Colicelli, J. (1997) Protein binding and signaling properties of RIN1 suggest a unique effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4954-4959.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Hancock, J.F. (2003) Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 373-384.
- Hartmann, H.A., Kahmann, R. and Bölker, M. (1996) The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Embo J*, **15**, 1632-1641.
- Hill, C.S., Wynne, J. and Treisman, R. (1995) The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell*, **81**, 1159-1170.
- Hlubek, A. (2004) Untersuchungen der kleinen GTPasen Cdc42 und Rac1 in *Ustilago maydis*: Funktioneller Vergleich und Regulation Diplomarbeit. *Fachbereich Biologie*. Philipps-Universität, Marburg.
- Ho, J. and Bretscher, A. (2001) Ras regulates the polarity of the yeast actin cytoskeleton through the stress response pathway. *Mol Biol Cell*, **12**, 1541-1555.
- Hofer, F., Fields, S., Schneider, C. and Martin, G.S. (1994) Activated Ras interacts with the Ral guanine nucleotide dissociation stimulator. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 11089-11093.
- Howe, L.R. and Marshall, C.J. (1993) Lysophosphatidic acid stimulates mitogen-activated protein kinase activation via a G-protein-coupled pathway requiring p21ras and p74raf-1. *J Biol Chem*, **268**, 20717-20720.
- Huang, W., Alessandrini, A., Crews, C.M. and Erikson, R.L. (1993) Raf-1 forms a stable complex with Mek1 and activates Mek1 by serine phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 10947-10951.
- Hurtado, C.A., Beckerich, J.M., Gaillardin, C. and Rachubinski, R.A. (2000) A rac homolog is required for induction of hyphal growth in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol*, **182**, 2376-2386.
- Innis, M.A. and Gelfand, D.H. (1990) Optimization of PCRs. In Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, pp. 3-20.

- Isomura, M., Kikuchi, A., Ohga, N. and Takai, Y. (1991) Regulation of binding of rhoB p20 to membranes by its specific regulatory protein, GDP dissociation inhibitor. *Oncogene*, **6**, 119-124.
- Jeong, J.W., Kim, D.H., Choi, S.Y. and Kim, H.B. (2001) Characterization of the CDC10 product and the timing of events of the budding site of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cells*, **12**, 77-83.
- Johnson, D.A., Akamine, P., Radzio-Andzelm, E., Madhusudan, M. and Taylor, S.S. (2001) Dynamics of cAMP-dependent protein kinase. *Chem Rev*, **101**, 2243-2270.
- Johnson, D.I. (1999) Cdc42: An essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiol Mol Biol Rev*, **63**, 54-105.
- Johnson, D.I. and Pringle, J.R. (1990) Molecular characterization of CDC42, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of cell polarity. *J Cell Biol*, **111**, 143-152.
- Kadota, J., Yamamoto, T., Yoshiuchi, S., Bi, E. and Tanaka, K. (2004) Septin ring assembly requires concerted action of polarisome components, a PAK kinase Cla4p, and the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **15**, 5329-5345.
- Kahmann, R., Steinberg, G., Basse, C. and Kämper, J. (2000) *Ustilago maydis*, the causative agent of corn smut disease. In *Fungal Pathology*. Kluwer academic publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 350-356.
- Kämper, J., Reichmann, M., Romeis, T., Bölker, M. and Kahmann, R. (1995) Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell*, **81**, 73-83.
- Katayama, S., Ozoe, F., Kurokawa, R., Tanaka, K., Nakagawa, T., Matsuda, H. and Kawamukai, M. (1996) Genetic analysis of the sam mutations, which induce sexual development with no requirement for nutritional starvation in fission yeast. *Biosci Biotechnol Biochem*, **60**, 994-999.
- Kayne, P.S. and Sternberg, P.W. (1995) Ras pathways in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev*, **5**, 38-43.
- Khosravi-Far, R., Solski, P.A., Clark, G.J., Kinch, M.S. and Der, C.J. (1995) Activation of Rac1, RhoA, and mitogen-activated protein kinases is required for Ras transformation. *Mol Cell Biol*, **15**, 6443-6453.
- Kim, A.S., Kakalis, L.T., Abdul-Manan, N., Liu, G.A. and Rosen, M.K. (2000) Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature*, **404**, 151-158.
- Klahre, U., Becker, C., Schmitt, A.C. and Kost, B. (2006) Nt-RhoGDI2 regulates Rac/Rop signaling and polar cell growth in tobacco pollen tubes. *Plant J*, **46**, 1018-1031.
- Knaus, M., Cameroni, E., Pedruzzi, I., Tatchell, K., De Virgilio, C. and Peter, M. (2005) The Bud14p-Glc7p complex functions as a cortical regulator of dynein in budding yeast. *Embo J*, **24**, 3000-3011.
- Kolluri, R., Tolias, K.F., Carpenter, C.L., Rosen, F.S. and Kirchhausen, T. (1996) Direct interaction of the Wiskott-Aldrich syndrome protein with the GTPase Cdc42. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 5615-5618.
- Kost, B., Lemichez, E., Spielhofer, P., Hong, Y., Tolias, K., Carpenter, C. and Chua, N.H. (1999) Rac homologues and compartmentalized phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate act in a common pathway to regulate polar pollen tube growth. *J Cell Biol*, **145**, 317-330.
- Kozma, R., Ahmed, S., Best, A. and Lim, L. (1995) The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol*, **15**, 1942-1952.
- Kronstad, J.W. and Leong, S.A. (1990) The b mating-type locus of *Ustilago maydis* contains variable and constant regions. *Genes Dev*, **4**, 1384-1395.

- Krugmann, S., Jordens, I., Gevaert, K., Driessens, M., Vandekerckhove, J. and Hall, A. (2001) Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53:Mena complex. *Curr Biol*, **11**, 1645-1655.
- Kübler, E., Mösch, H.U., Rupp, S. and Lisanti, M.P. (1997) Gpa2p, a G-protein alpha-subunit, regulates growth and pseudohyphal development in *Saccharomyces cerevisiae* via a cAMP-dependent mechanism. *J Biol Chem*, **272**, 20321-20323.
- Kunda, P., Paglini, G., Quiroga, S., Kosik, K. and Caceres, A. (2001) Evidence for the involvement of Tiam1 in axon formation. *J Neurosci*, **21**, 2361-2372.
- Kyriakis, J.M. (1999) Signaling by the germinal center kinase family of protein kinases. *J Biol Chem*, **274**, 5259-5262.
- Lamaze, C., Chuang, T.H., Terlecky, L.J., Bokoch, G.M. and Schmid, S.L. (1996) Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac. *Nature*, **382**, 177-179.
- Lambert, J.M., Lambert, Q.T., Reuther, G.W., Malliri, A., Siderovski, D.P., Sondek, J., Collard, J.G. and Der, C.J. (2002) Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K-independent mechanism. *Nat Cell Biol*, **4**, 621-625.
- Lamson, R.E., Winters, M.J. and Pryciak, P.M. (2002) Cdc42 regulation of kinase activity and signaling by the yeast p21-activated kinase Ste20. *Mol Cell Biol*, **22**, 2939-2951.
- Leberer, E., Marcus, D., Dignard, D., Johnson, L., Ushinsky, S., Thomas, D.Y. and Schroppel, K. (2001) Ras links cellular morphogenesis to virulence by regulation of the MAP kinase and cAMP signalling pathways in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Microbiol*, **42**, 673-687.
- Lee, N. and Kronstad, J.W. (2002) ras2 Controls morphogenesis, pheromone response, and pathogenicity in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell*, **1**, 954-966.
- Leeuwen, F.N., Kain, H.E., Kammen, R.A., Michiels, F., Kranenburg, O.W. and Collard, J.G. (1997) The guanine nucleotide exchange factor Tiam1 affects neuronal morphology; opposing roles for the small GTPases Rac and Rho. *J Cell Biol*, **139**, 797-807.
- Lemmon, M.A. and Ferguson, K.M. (1998) Pleckstrin homology domains. *Curr Top Microbiol Immunol*, **228**, 39-74.
- Leveleki, L., Mahlert, M., Sandrock, B. and Böcker, M. (2004) The PAK family kinase Cla4 is required for budding and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **54**, 396-406.
- Li, N., Batzer, A., Daly, R., Yajnik, V., Skolnik, E., Chardin, P., Bar-Sagi, D., Margolis, B. and Schlessinger, J. (1993) Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature*, **363**, 85-88.
- Li, R. (1997) Bee1, a yeast protein with homology to Wiscott-Aldrich syndrome protein, is critical for the assembly of cortical actin cytoskeleton. *J Cell Biol*, **136**, 649-658.
- Li, Y., Chen, C. and Chang, E. (2000) Fission Yeast Ras1 Effector Scd1 Interacts With the Spindle and Affects Its Proper Formation. *Genetics*, **156**, 995-1004.
- Lippincott, J., Shannon, K.B., Shou, W., Deshaies, R.J. and Li, R. (2001) The Tem1 small GTPase controls actomyosin and septin dynamics during cytokinesis. *J Cell Sci*, **114**, 1379-1386.
- Longtine, M.S. and Bi, E. (2003) Regulation of septin organization and function in yeast. *Trends Cell Biol*, **13**, 403-409.
- Longtine, M.S., Theesfeld, C.L., McMillan, J.N., Weaver, E., Pringle, J.R. and Lew, D.J. (2000) Septin-dependent assembly of a cell cycle-regulatory module in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **20**, 4049-4061.
- Lorenz, M.C. and Heitman, J. (1997) Yeast pseudohyphal growth is regulated by GPA2, a G protein alpha homolog. *Embo J*, **16**, 7008-7018.
- Loubradou, G., Brachmann, A., Feldbrugge, M. and Kahmann, R. (2001) A homologue of the transcriptional repressor Ssn6p antagonizes cAMP signalling in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **40**, 719-730.

- Luo, L., Hensch, T.K., Ackerman, L., Barbel, S., Jan, L.Y. and Jan, Y.N. (1996) Differential effects of the Rac GTPase on Purkinje cell axons and dendritic trunks and spines. *Nature*, **379**, 837-840.
- Luo, L., Liao, Y.J., Jan, L.Y. and Jan, Y.N. (1994) Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: Drosophila Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes Dev*, **8**, 1787-1802.
- Machesky, L.M. and Insall, R.H. (1998) Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol*, **8**, 1347-1356.
- Mackay, D.J., Nobes, C.D. and Hall, A. (1995) The Rho's progress: a potential role during neuritogenesis for the Rho family of GTPases. *Trends Neurosci*, **18**, 496-501.
- Mahlert, M. (2002) Konstruktion und Untersuchung von Mutanten von *cdc42* in *Ustilago maydis*. Diplomarbeit. *Fachbereich Biologie*. Philipps-Universität, Marburg.
- Mahlert, M., Leveleki, L., Hlubek, A., Sandroch, B. and Bölker, M. (2006) Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **59**, 567-578.
- Mayorga, M.E. and Gold, S.E. (2001) The *ubc2* gene of *Ustilago maydis* encodes a putative novel adaptor protein required for filamentous growth, pheromone response and virulence. *Mol Microbiol*, **41**, 1365-1379.
- Menard, L., Tomhave, E., Casey, P.J., Uhing, R.J., Snyderman, R. and Didsbury, J.R. (1992) Rac1, a low-molecular-mass GTP-binding-protein with high intrinsic GTPase activity and distinct biochemical properties. *Eur J Biochem*, **206**, 537-546.
- Michaelson, D., Silletti, J., Murphy, G., D'Eustachio, P., Rush, M. and Philips, M.R. (2001) Differential localization of Rho GTPases in live cells: Regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *Journal of Cell Biology*, **152**, 111-126.
- Miki, H., Suetsugu, S. and Takenawa, T. (1998) WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *Embo J*, **17**, 6932-6941.
- Miki, H., Yamaguchi, H., Suetsugu, S. and Takenawa, T. (2000) IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature*, **408**, 732-735.
- Milburn, M.V., Tong, L., deVos, A.M., Brunger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S. and Kim, S.H. (1990) Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science*, **247**, 939-945.
- Miller, P.J. and Johnson, D.I. (1994) Cdc42p GTPase is involved in controlling polarized cell growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol*, **14**, 1075-1083.
- Minden, A., Lin, A., Claret, F.X., Abo, A. and Karin, M. (1995) Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell*, **81**, 1147-1157.
- Mitchison, J.M. and Nurse, P. (1985) Growth in cell length in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci*, **75**, 357-376.
- Mösch, H.U. and Fink, G.R. (1997) Dissection of filamentous growth by transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **145**, 671-684.
- Mösch, H.U., Kübler, E., Krappmann, S., Fink, G.R. and Braus, G.H. (1999) Crosstalk between the Ras2p-controlled mitogen-activated protein kinase and cAMP pathways during invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **10**, 1325-1335.
- Mösch, H.U., Roberts, R.L. and Fink, G.R. (1996) Ras2 signals via the Cdc42/Ste20/mitogen-activated protein kinase module to induce filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 5352-5356.
- Moss, J. and Vaughan, M. (1995) Structure and function of ARF proteins: activators of cholera toxin and critical components of intracellular vesicular transport processes. *J Biol Chem*, **270**, 12327-12330.

- Müller, O., Johnson, D.I. and Mayer, A. (2001) Cdc42p functions at the docking stage of yeast vacuole membrane fusion. *Embo J*, **20**, 5657-5665.
- Müller, P. (2003) Signalweiterleitung in *Ustilago maydis*: Die Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Kaskade kontrolliert Pheromonantwort und pathogene Entwicklung. Dissertation. *Fachbereich Biologie*. Philipps-Universität, Marburg.
- Müller, P., Aichinger, C., Feldbrügge, M. and Kahmann, R. (1999) The MAP kinase kpp2 regulates mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **34**, 1007-1017.
- Müller, P., Katzenberger, J.D., Loubradou, G. and Kahmann, R. (2003a) Guanyl nucleotide exchange factor Ssl2 and Ras2 regulate filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell*, **2**, 609-617.
- Müller, P., Weinzierl, G., Brachmann, A., Feldbrugge, M. and Kahmann, R. (2003b) Mating and pathogenic development of the Smut fungus *Ustilago maydis* are regulated by one mitogen-activated protein kinase cascade. *Eukaryot Cell*, **2**, 1187-1199.
- Munemitsu, S., Innis, M.A., Clark, R., McCormick, F., Ullrich, A. and Polakis, P. (1990) Molecular cloning and expression of a G25K cDNA, the human homolog of the yeast cell cycle gene CDC42. *Mol Cell Biol*, **10**, 5977-5982.
- Nagata, Y. and Burger, M.M. (1974) Wheat germ agglutinin. Molecular characteristics and specificity for sugar binding. *J Biol Chem*, **249**, 3116-3122.
- Nichols, C.B., Fraser, J.A. and Heitman, J. (2004) PAK kinases Ste20 and Pak1 govern cell polarity at different stages of mating in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Biol Cell*, **15**, 4476-4489.
- Obaishi, H., Nakanishi, H., Mandai, K., Satoh, K., Satoh, A., Takahashi, K., Miyahara, M., Nishioka, H., Takaishi, K. and Takai, Y. (1998) Frabin, a novel FGD1-related actin filament-binding protein capable of changing cell shape and activating c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem*, **273**, 18697-18700.
- O'Donnell, K.L. and McLaughlin, D.J. (1984) Postmeiotic mitosis, basidiospore development, and septation in *Ustilago maydis*. *Mycologia*, **76**, 486-502.
- Olivier, J.P., Raabe, T., Henkemeyer, M., Dickson, B., Mbamalu, G., Margolis, B., Schlessinger, J., Hafen, E. and Pawson, T. (1993) A Drosophila SH2-SH3 adaptor protein implicated in coupling the sevenless tyrosine kinase to an activator of Ras guanine nucleotide exchange, Sos. *Cell*, **73**, 179-191.
- Onken, B., Wiener, H., Philips, M.R. and Chang, E.C. (2006) Compartmentalized signaling of Ras in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 9045-9050.
- Orlowski, M. (1994) Yeast/Mycelial Dimorphism. In Wessels, J.G. and Meinhardt, F. (eds.), *The Mycota*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Vol. Growth, Differentiation and Sexuality, pp. 143-162.
- Ottillie, S., Miller, P.J., Johnson, D.I., Creasy, C.L., Sells, M.A., Bagrodia, S., Forsburg, S.L. and Chernoff, J. (1995) Fission yeast pak1+ encodes a protein kinase that interacts with Cdc42p and is involved in the control of cell polarity and mating. *Embo J*, **14**, 5908-5919.
- Pai, E.F., Kabsch, W., Krengel, U., Holmes, K.C., John, J. and Wittinghofer, A. (1989) Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature*, **341**, 209-214.
- Pan, X. and Heitman, J. (1999) Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **19**, 4874-4887.
- Pasteris, N.G., Cadle, A., Logie, L.J., Porteous, M.E., Schwartz, C.E., Stevenson, R.E., Glover, T.W., Wilroy, R.S. and Gorski, J.L. (1994) Isolation and characterization of the faciogenital dysplasia (Aarskog-Scott syndrome) gene: a putative Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor. *Cell*, **79**, 669-678.

- Plutner, H., Cox, A.D., Pind, S., Khosravi-Far, R., Bourne, J.R., Schwaninger, R., Der, C.J. and Balch, W.E. (1991) Rab1b regulates vesicular transport between the endoplasmic reticulum and successive Golgi compartments. *J Cell Biol*, **115**, 31-43.
- Ponting, C.P. and Benjamin, D.R. (1996) A novel family of Ras-binding domains. *Trends Biochem Sci*, **21**, 422-425.
- Pringle, J.R., Bi, E., Harkins, H.A., Zahner, J.E., De Virgilio, C., Chant, J., Corrado, K. and Fares, H. (1995) Establishment of cell polarity in yeast. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **60**, 729-744.
- Rajendran, L. and Simons, K. (2005) Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci*, **118**, 1099-1102.
- Rasband, W. (1997) ImageJ. *National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA*: <http://rsb.info.nih.gov/ij>, **2005**.
- Regenfelder, E., Spellig, T., Hartmann, A., Lauenstein, S., Bolker, M. and Kahmann, R. (1997) G proteins in *Ustilago maydis*: transmission of multiple signals? *Embo J*, **16**, 1934-1942.
- Richman, T.J., Toenjes, K.A., Morales, S.E., Cole, K.C., Wasserman, B.T., Taylor, C.M., Koster, J.A., Whelihan, M.F. and Johnson, D.I. (2004) Analysis of cell-cycle specific localization of the Rdi1p RhoGDI and the structural determinants required for Cdc42p membrane localization and clustering at sites of polarized growth. *Curr Genet*, **45**, 339-349.
- Ridley, A.J. and Hall, A. (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, **70**, 389-399.
- Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D. and Hall, A. (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, **70**, 401-410.
- Roberts, R.L. and Fink, G.R. (1994) Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev*, **8**, 2974-2985.
- Roberts, R.L., Mosch, H.U. and Fink, G.R. (1997) 14-3-3 proteins are essential for RAS/MAPK cascade signaling during pseudohyphal development in *S. cerevisiae*. *Cell*, **89**, 1055-1065.
- Rocks, O., Peyker, A., Kahms, M., Verveer, P., Koerner, C., Lumbierres, M., Kuhlmann, J., Waldmann, H., Wittinghofer, A. and Bastiaens, P. (2005) An Acylation Cycle Regulates Localization and Activity of Palmitoylated Ras Isoforms. *Science*, **307**, 1746-1752.
- Rodriguez-Viciana, P., Warne, P.H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M.J., Waterfield, M.D. and Downward, J. (1994) Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature*, **370**, 527-532.
- Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T. and Kirschner, M.W. (1999) The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell*, **97**, 221-231.
- Ruiz-Herrera, J. and Martinez-Espinoza, A.D. (1998) The fungus *Ustilago maydis*, from the aztec cuisine to the research laboratory. *Int Microbiol*, **1**, 149-158.
- Sanchez-Martinez, C. and Perez-Martin, J. (2001) Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis*--similar inputs, different outputs. *Curr Opin Microbiol*, **4**, 214-221.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **74**, 5463-5467.
- Sasaki, T., Kikuchi, A., Araki, S., Hata, Y., Isomura, M., Kuroda, S. and Takai, Y. (1990) Purification and characterization from bovine brain cytosol of a protein that inhibits

- the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to smg p25A, a ras p21-like GTP-binding protein. *J Biol Chem*, **265**, 2333-2337.
- Scheffer, J., Chen, C., Heidrich, P., Dickman, M.B. and Tudzynski, P. (2005) A CDC42 Homologue in *Claviceps purpurea* Is Involved in Vegetative Differentiation and Is Essential for Pathogenicity. *Eukaryot Cell*, **4**, 1228-1238.
- Scheffzek, K., Lautwein, A., Kabsch, W., Ahmadian, M.R. and Wittinghofer, A. (1996) Crystal structure of the GTPase-activating domain of human p120GAP and implications for the interaction with Ras. *Nature*, **384**, 591-596.
- Schmidt, A. and Hall, A. (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev*, **16**, 1587-1609.
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schäfer, W., Martin, T., Herskowitz, I. and Kahmann, R. (1990) The b alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell*, **60**, 295-306.
- Seeley, E.S., Kato, M., Margolis, N., Wickner, W. and Eitzen, G. (2002) Genomic analysis of homotypic vacuole fusion. *Mol Biol Cell*, **13**, 782-794.
- Sells, M.A. and Chernoff, J. (1997) Emerging from the Pak: The p21-activated protein kinase family. *Trends Cell Biol*, **7**, 162-167.
- Shinjo, K., Koland, J.G., Hart, M.J., Narasimhan, V., Johnson, D.I., Evans, T. and Cerione, R.A. (1990) Molecular cloning of the gene for the human placental GTP-binding protein Gp (G25K): identification of this GTP-binding protein as the human homolog of the yeast cell-division-cycle protein CDC42. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 9853-9857.
- Simon, M.N., De Virgilio, C., Souza, B., Pringle, J.R., Abo, A. and Reed, S.I. (1995) Role for the Rho-family GTPase Cdc42 in yeast mating-pheromone signal pathway. *Nature*, **376**, 702-705.
- Smith, D.G., Garcia-Pedrajas, M.D., Hong, W., Yu, Z., Gold, S.E. and Perlin, M.H. (2004) An ste20 Homologue in *Ustilago maydis* Plays a Role in Mating and Pathogenicity. *Eukaryot Cell*, **3**, 180-189.
- Snetselaar, K.M. (1993) Microscopic Observation of *Ustilago maydis* Mating Interactions. *Exp Mycol*, **17**, 345-355.
- Snetselaar, K.M., Bölker, M. and Kahmann, R. (1996) *Ustilago maydis* Mating Hyphae Orient Their Growth toward Pheromone Sources. *Fungal Genet Biol*, **20**, 299-312.
- Snetselaar, K.M. and Mims, C.W. (1992) Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia*, **84**, 193-202.
- Southern, E. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, **98**, 503-517.
- Spaargaren, M. and Bischoff, J.R. (1994) Identification of the guanine nucleotide dissociation stimulator for Ral as a putative effector molecule of R-ras, H-ras, K-ras, and Rap. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 12609-12613.
- Spellig, T., Bölker, M., Lottspeich, F., Frank, R.W. and Kahmann, R. (1994) Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Embo J*, **13**, 1620-1627.
- Stefan, C.J. and Blumer, K.J. (1999) A syntaxin homolog encoded by VAM3 mediates down-regulation of a yeast G protein-coupled receptor. *J Biol Chem*, **274**, 1835-1841.
- Stein, M.P., Dong, J. and Wandinger-Ness, A. (2003) Rab proteins and endocytic trafficking: potential targets for therapeutic intervention. *Adv Drug Deliv Rev*, **55**, 1421-1437.
- Steinberg, G., Schliwa, M., Lehmler, C., Bölker, M., Kahmann, R. and McIntosh, J.R. (1998) Kinesin from the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis* is involved in vacuole formation and cytoplasmic migration. *J Cell Sci*, **111**, 2235-2246.
- Stewart, A. and Deacon, J.W. (1995) Vital fluorochromes as tracers for fungal growth studies. *Biotech Histochem*, **70**, 57-65.

- Straube, A., Enard, W., Berner, A., Wedlich-Soldner, R., Kahmann, R. and Steinberg, G. (2001) A split motor domain in a cytoplasmic dynein. *Embo J*, **20**, 5091-5100.
- Straube, A., Weber, I. and Steinberg, G. (2005) A novel mechanism of nuclear envelope break-down in a fungus: nuclear migration strips off the envelope. *Embo J*, **24**, 1674-1685.
- Symons, M., Derry, J.M., Karlak, B., Jiang, S., Lemahieu, V., McCormick, F., Francke, U. and Abo, A. (1996) Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell*, **84**, 723-734.
- Szabo, R. (2001) Cla4 protein kinase is essential for filament formation and invasive growth of *Yarrowia lipolytica*. *Mol Genet Genomics*, **265**, 172-179.
- Takai, Y., Sasaki, T. and Matozaki, T. (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*, **81**, 153-208.
- Tall, G.G., Barbieri, M.A., Stahl, P.D. and Horazdovsky, B.F. (2001) Ras-activated endocytosis is mediated by the Rab5 guanine nucleotide exchange activity of RIN1. *Dev Cell*, **1**, 73-82.
- Tatchell, K., Chaleff, D.T., DeFeo-Jones, D. and Scolnick, E.M. (1984) Requirement of either of a pair of ras-related genes of *Saccharomyces cerevisiae* for spore viability. *Nature*, **309**, 523-527.
- Tatchell, K., Robinson, L.C. and Breitenbach, M. (1985) RAS2 of *Saccharomyces cerevisiae* is required for gluconeogenic growth and proper response to nutrient limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 3785-3789.
- Taylor, S.S., Buechler, J.A. and Yonemoto, W. (1990) cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem*, **59**, 971-1005.
- Thevelein, J.M. (1991) Fermentable sugars and intracellular acidification as specific activators of the RAS-adenylate cyclase signalling pathway in yeast: the relationship to nutrient-induced cell cycle control. *Mol Microbiol*, **5**, 1301-1307.
- Thevelein, J.M. and de Winde, J.H. (1999) Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, **33**, 904-918.
- Toda, T., Uno, I., Ishikawa, T., Powers, S., Kataoka, T., Broek, D., Cameron, S., Broach, J., Matsumoto, K. and Wigler, M. (1985) In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell*, **40**, 27-36.
- Unrau, P. and Holliday, R. (1970) A search for temperature-sensitive mutants of *Ustilago maydis* blocked in DNA synthesis. *Genet Res*, **15**, 157-169.
- Valencia, A., Chardin, P., Wittinghofer, A. and Sander, C. (1991) The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry*, **30**, 4637-4648.
- Vallim, M.A., Nichols, C.B., Fernandes, L., Cramer, K.L. and Alspaugh, J.A. (2005) A Rac homolog functions downstream of Ras1 to control hyphal differentiation and high-temperature growth in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, **4**, 1066-1078.
- Vetter, I.R. and Wittinghofer, A. (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*, **294**, 1299-1304.
- Vida, T.A. and Emr, S.D. (1995) A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol*, **128**, 779-792.
- Vojtek, A.B., Hollenberg, S.M. and Cooper, J.A. (1993) Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell*, **74**, 205-214.
- Wachtler, V., Rajagopalan, S. and Balasubramanian, M.K. (2003) Sterol-rich plasma membrane domains in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci*, **116**, 867-874.

- Walker, S.J. and Brown, H.A. (2002) Specificity of Rho insert-mediated activation of phospholipase D1. *J Biol Chem*, **277**, 26260-26267.
- Walker, S.J., Wu, W.J., Cerione, R.A. and Brown, H.A. (2000) Activation of phospholipase D1 by Cdc42 requires the Rho insert region. *J Biol Chem*, **275**, 15665-15668.
- Wassarman, D.A., Therrien, M. and Rubin, G.M. (1995) The Ras signaling pathway in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev*, **5**, 44-50.
- Waugh, M.S., Nichols, C.B., DeCesare, C.M., Cox, G.M., Heitman, J. and Alspaugh, J.A. (2002) Ras1 and Ras2 contribute shared and unique roles in physiology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, **148**, 191-201.
- Waugh, M.S., Vallim, M.A., Heitman, J. and Alspaugh, J.A. (2003) Ras1 controls pheromone expression and response during mating in *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet Biol*, **38**, 110-121.
- Wedlich-Söldner, R., Altschuler, S., Wu, L. and Li, R. (2003) Spontaneous cell polarization through actomyosin-based delivery of the Cdc42 GTPase. *Science*, **299**, 1231-1235.
- Wedlich-Söldner, R., Bölker, M., Kahmann, R. and Steinberg, G. (2000) A putative endosomal t-SNARE links exo- and endocytosis in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Embo J*, **19**, 1974-1986.
- Weeks, G. and Spiegelman, G.B. (2003) Roles played by Ras subfamily proteins in the cell and developmental biology of microorganisms. *Cell Signal*, **15**, 901-909.
- Weinzierl, G., Leveleki, L., Hassel, A., Kost, G., Wanner, G. and Bölker, M. (2002) Regulation of cell separation in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **45**, 219-231.
- Wennerberg, K. and Der, C.J. (2004) Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci*, **117**, 1301-1312.
- Wichmann, H., Hengst, L. and Gallwitz, D. (1992) Endocytosis in yeast: evidence for the involvement of a small GTP-binding protein (Ypt7p). *Cell*, **71**, 1131-1142.
- Willumsen, B.M., Christensen, A., Hubbert, N.L., Papageorge, A.G. and Lowy, D.R. (1984) The p21 ras C-terminus is required for transformation and membrane association. *Nature*, **310**, 583-586.
- Wozniak, M.A., Kwong, L., Chodniewicz, D., Klemke, R.L. and Keely, P.J. (2005) R-Ras controls membrane protrusion and cell migration through the spatial regulation of Rac and Rho. *Mol Biol Cell*, **16**, 84-96.
- Wu, W.J., Leonard, D.A., R, A.C. and Manor, D. (1997) Interaction between Cdc42Hs and RhoGDI is mediated through the Rho insert region. *J Biol Chem*, **272**, 26153-26158.
- Ye, X. and Szaniszló, P.J. (2000) Expression of a constitutively active Cdc42 homologue promotes development of sclerotic bodies but represses hyphal growth in the zoopathogenic fungus *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. *J Bacteriol*, **182**, 4941-4950.
- Yun, C., Cho, H., Kim, S.J., Lee, J.H., Park, S.Y. and Chan, G.K. (2004) Mitotic aberration coupled with centrosome amplification is induced by hepatitis B virus X oncoprotein via the Ras-mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein pathway. *Mol Cancer Res*, **2**, 159-169.
- Zhang, S., Han, J., Sells, M.A., Chernoff, J., Knaus, U.G., Ulevitch, R.J. and Bokoch, G.M. (1995) Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J Biol Chem*, **270**, 23934-23936.
- Ziman, M., O'Brien, J.M., Ouellette, L.A., Church, W.R. and Johnson, D.I. (1991) Mutational analysis of CDC42Sc, a *Saccharomyces cerevisiae* gene that encodes a putative GTP-binding protein involved in the control of cell polarity. *Mol Cell Biol*, **11**, 3537-3544.

Anhang

Movies

Die Movies wurden als ergänzendes Material zu folgendem Artikel veröffentlicht:

Mahlert, M., Leveleki, L., Hlubek, A., Sandrock, B. and Bölker, M. (2006) Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **59**, 567-578.

Sie können von der Homepage der Zeitschrift *Molecular Microbiology* unter folgender Adresse heruntergeladen werden:

<http://www.blackwell-synergy.com/doi/full/10.1111/j.1365-2958.2005.04952.x>

Movie 1: Die Überexpression von Rac1 induziert Filamentbildung.

Die Überexpression von *rac1* unter der Kontrolle des *crg*-Promotors wurde wie im Methodenteil beschrieben auf mit YNB-A-Agarose beschichteten Objektträgern induziert. Anstelle einer normalen Knospenbildung beginnen die Zellen mit der Ausbildung langer Filamente, die sich an einem Zellpol formen. Die Zellen sind in der Lage, an diesem Zellpol noch weitere Filamente auszubilden. Der Film wurde mit 12 Frames pro Stunde aufgenommen und spielt mit einer Geschwindigkeit von 12 Frames pro Sekunde, d.h. eine Sekunde Filmzeit entspricht 60 Minuten Realzeit. Vergleiche Abbildung 2-7.

Movie 2: Die Überexpression von Rac1^{Q61L} induziert Vakuolisierung.

Die Überexpression von Rac1^{Q61L} wurde auf mit YNB-A-Agarose beschichteten Objektträgern induziert. 90 Minuten später wurden die Zellen auf einen mit YNB-A-Agarose beschichteten Objektträger überführt. Die Expression des konstitutiv aktiven G-Proteins resultiert in einem Wachstumsstopp und einer massiven Vakuolenbildung. Der Film wurde mit 10 Frames pro Stunde aufgenommen und spielt mit einer Geschwindigkeit von 10 Frames pro Sekunde, d.h. eine Sekunde Filmzeit entspricht 60 Minuten Realzeit. Vergleiche Abbildung 2-10.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. Michael Bölker für das interessante Thema, für seine stete Diskussionsfreude und seinen Einfallsreichtum.

Bei Herrn Professor Dr. Hans-Ulrich Mösch bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens. Ebenso danke ich Herrn Professor Dr. Alfred Batschauer und Herrn PD Dr. Detlev Buttgeriet für ihre Bereitschaft, der Prüfungskommission anzugehören.

Auch Ute Kämper und Björn Sandrock danke ich für viele Ideen und Anregungen. Insbesondere bin ich Björn Sandrock dankbar für seine unermüdliche und aufmerksame Korrektur der schriftlichen Arbeit.

Andrea Hlubek, Kay Schink, Annette Bauer, Susanne Rindt und Verena Welteke danke ich für unser wunderbares Teamwork. Ein so reger Austausch von Vektoren, Stämmen, Gedanken und Ideen fördert den Erfolg und den Spaß an der Sache ungemein. Aber auch Beate Teichmann und Sandra Hewald gebührt hier mein besonderer Dank für viel Unterstützung und Tips, vor allem beim Kampf mit der RNA. Kay Schink danke ich sehr für seine schnelle unkomplizierte Hilfe, wenn ein Computer mal gar nicht das getan hat, was er sollte.

Auch den übrigen, aktuellen und ehemaligen Gruppenmitgliedern Stefanie Alter, Sonja Frieser, Christian Böhmer, Diana Kruhl, Marco Caliaro, Sabrina Patzak, Patrick Nilles, Mareike Rust und in frühen Zeiten Leonora Leveleki und Katharina Josephs, aber auch den Mitgliedern der AG Mösch und der AG Klein danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die lustige Zeit, die wir zusammen verbracht haben und an die ich gerne zurückdenken werde. Diana Kruhl, Sandra Hewald und später Marco Caliaro gilt mein Dank für viele lustige Donnerstagabende. Marisa Piscator danke ich für ihre technische Unterstützung. Der guten Seele des Labors Heide-Barbara Böttner danke ich für ihre lebenswerte Art und ihre Sorge um unser leibliches Wohl, durch die so mancher Montagmorgen deutlich besser anfang. Bei Hanne Steinebach bedanke ich mich für ihr Engagement für unsere Getränke und den lebenswichtigen Kaffee und für die unermüdliche Ausrichtung der Weihnachtsfeiern.

Besonderer Dank gilt auch Christoph und Kilian für aufmunternde Worte, wenn es mal schwierig wurde, und Felix, der immer ansprechbar bei Fragen und Problemen war. Der größte Dank aber gilt meinen Eltern für die riesige Unterstützung, ohne die dies alles nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Michael Mahlert
Geburtsdatum	06.02.1977
Geburtsort	Rotenburg/Fulda

Schulbildung

1984-1988	Grundschulausbildung in der Theodor-Heuss-Schule in Marburg
1988-1997	Besuch des Gymnasium Philippinum in Marburg
25.6.1995	Nachweis des Graecums am Gymnasium Philippinum Marburg
5.7.1995	Nachweis des Latinums am Gymnasium Philippinum Marburg
20.6.1997	Erlangung der allgemeinen Hochschulreife und Auszeichnung mit dem Robert-Freund-Preis für hervorragende musikalische Leistungen am Gymnasium Philippinum Marburg

Studium

1997-2002	Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg
1.12.2001-30.09.2002	Diplomarbeit am Fachbereich Biologie, Abteilung Molekulargenetik, der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Bölker

Promotion

seit 1.11.2002	Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bölker an der Philipps-Universität Marburg zum Thema „Charakterisierung kleiner G-Proteine der Ras- und Rho/Rac-Familie in <i>Ustilago maydis</i> : Zentrale Schalter in komplexen Netzwerken und ihr Einfluss auf die Organisation der Zellmorphologie“
----------------	---